

Tesis de Posgrado

Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de Bufo arenarum : análisis descriptivo y experimental

Alonso, Diana Graciela

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alonso, Diana Graciela. (2003). Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de Bufo arenarum : análisis descriptivo y experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3581_Alonso.pdf

Cita tipo Chicago:

Alonso, Diana Graciela. "Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de Bufo arenarum : análisis descriptivo y experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3581_Alonso.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DESARROLLO Y DIFERENCIACION DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS E INTERNAS EN EMBRIONES Y LARVAS DE Bufo arenarum. ANALISIS DESCRIPTIVO Y EXPERIMENTAL.

Autora : Lic. Diana Graciela Alonso

Director : Dr. Dante Agustín Paz

Instituto de Neurociencias (INEUCI - CONICET)
Depto. de Biodiversidad y Biología Experimental (FCEyN - UBA)

Tesis presentada para optar por el título de
Dr. en Ciencias Biológicas

Ciudad de Buenos Aires
Abril de 2003

INDICE

TÍTULO	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	6
INTRODUCCION GENERAL	9
OBJETIVOS GENERALES	13
CAPITULO 1	14
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	48
CAPITULO 2	52
INTRODUCCIÓN	53
OBJETIVOS	60
MATERIALES Y MÉTODOS	60
RESULTADOS	64
DISCUSIÓN	71
CAPITULO 3	77
INTRODUCCIÓN	78
OBJETIVOS	85
MATERIALES Y MÉTODOS	86
RESULTADOS	89

DISCUSIÓN	101
CAPITULO 4	108
INTRODUCCIÓN	109
OBJETIVOS	112
MATERIALES Y MÉTODOS	113
RESULTADOS	120
DISCUSIÓN	132
CAPITULO 5	136
INTRODUCCIÓN	137
OBJETIVOS	139
MATERIALES Y MÉTODOS	140
RESULTADOS	142
DISCUSIÓN.....	149
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	156

DEDICATORIA

- ♣ *A mis hijos Lara y Santiago, la maravilla más grande de mi vida.*
- ♣ *A mis padres Susana y Héctor, que me hicieron sentir que mis hermanos y yo éramos lo mas maravilloso de sus vidas.*
- ♣ *A mi amor Mario, el hombre que me acompañó imbatible en los peores y mejores momentos, y que me convenció de emprender la mayor aventura de nuestras vidas.*

AGRADECIMIENTOS

¿Por donde se comienza a agradecer a toda la gente que ayudó a concretar esta tesis?

Quizás siguiendo un relativo orden cronológico.

Por eso, los primeros sin dudarlo, son mis padres Susana y Héctor, que me acompañaron e incentivaron en todas mis etapas de estudio, dándome libertad y apoyo incondicional en todas mis elecciones.

A mis hermanos, Silvina y Martín, que cubrieron mis horarios de trabajo mientras me iba al laboratorio.

A los millones de argentinos que con sus impuestos pagaron mis estudios en la Universidad y mis becas de CONICET.

A los Doctores Armando Pisano y Jorge Affani mis directores de beca, que me brindaron un lugar de trabajo en los laboratorios del LABINE y del INEUCI.

A mi gran compañero de trabajo, mejor amigo y maravilloso director de tesis, el Dr. Dante Paz .

A mis compañeros del laboratorio, Gabriela, Leandro y Sergio, con los que amenizamos las horas de trabajo alrededor del mate y el café, nos ayudamos mutuamente e intercambiamos múltiples consejos; a los técnicos del LABINE, Laura, Hernán y María José, que me ayudaron con numerosos preparados histológicos.

A los investigadores extranjeros que solo conociéndome por carta, me enviaron muestras de anticuerpos y colorantes, y numerosos consejos.

A las brujas y los amigos de siempre, que me estimularon a continuar con la redacción de esta Tesis a pesar del paso de los años.

A mis queridísimos hijos, Santi y Lara, que cedieron horas de mi compañía para que yo siguiera escribiendo.

Y a mi queridísimo esposo, Mario, que estuvo en todas las etapas de esta tesis, como amigo y consejero, empujándome para que terminara, y como espectacular editor general, responsable de la organización y estética de los textos, figuras, y presentación

RESUMEN

Las branquias externas de anuros son estructuras respiratorias embrionarias que desaparecen en las larvas, mientras que las branquias internas permanecen hasta la metamorfosis.

La morfología branquial fue estudiada con microscopio óptico en embriones y larvas de *Bufo arenarum*. Los filamentos branquiales externos se originan a partir de los arcos viscerales 3 a 5, previamente al estadio de latido cardíaco; estos filamentos presentan una doble capa epidérmica, células mesenquimáticas y algunos capilares. Las branquias son recubiertas por completo por el opérculo en el estadio 25 y finalmente desaparecen.

Los cuatro pares de branquias internas se encuentran ubicadas en dos cámaras branquiales a cada lado del corazón; cada branquia esta formada por un arco branquial en el cual se insertan ventralmente los filamentos respiratorios y dorsalmente los filtros branquiales. Cada filamento esta compuesto por un eje y numerosas ramificaciones, que presentan una cobertura epitelial, tejido conectivo, vasos sanguíneos y capilares mesodérmicos. El sistema branquial es sostenido por el cartílago del arco branquial; por debajo se encuentran las arterias branquiales aferentes y eferentes y el músculo constrictor.

Si bien el proceso de regresión de las branquias internas de anuros ha sido bastante dilucidado, la desaparición de las branquias externas ha sido poco estudiada hasta el momento.

La apoptosis es un tipo de muerte celular presente durante el desarrollo embrionario, caracterizada por la fragmentación de ADN. En el presente trabajo, células apoptóticas fueron estudiadas en el epitelio de las branquias externas con el microscopio óptico, y fueron detectados *in situ* fragmentos de ADN a través de

la técnica TUNEL. La presencia y distribución de núcleos marcados fue mayor en los estadios 24 y 25, aunque también se encontraron en los restantes estadios embrionarios analizados.

Un ensayo inmunohistoquímico para detectar PCNA (proliferating cell nuclear antigen) identifica células en todas las fases activas del ciclo celular. En este estudio, esta metodología permitió marcar las células proliferativas en tejidos embrionarios del sistema branquial, durante la regresión de las branquias externas.

La presencia de apoptosis en el epitelio de las branquias externas progresa simultáneamente con una activa proliferación en las branquias internas. Los resultados obtenidos muestran la importancia de la apoptosis en la regresión de las branquias externas, ya que este tipo de muerte celular parece ser el proceso principal para reajustar el número celular del epitelio branquial, preparándolo para el nuevo sistema respiratorio de las larvas

No existe información previa acerca de la distribución de componentes del citoesqueleto en las branquias de anuros. El objeto de este trabajo fue conocer la distribución de algunos de las principales proteínas citoesqueléticas en las branquias de *Bufo arenarum*; para ello, se efectuó un ensayo inmunocitoquímico en las branquias externas e internas. Se observó inmunorreacción para actina en el epitelio y tejido conectivo; la inmunodetección a miosina estuvo restringida al tejido conectivo de las branquias internas. Se encontró expresión de α y β tubulinas en el epitelio y las células ciliadas. La inmunocoloración para la vimentina fue débil en las células epiteliales e intensa en el tejido conectivo. La inmunorreacción positiva para las citoqueratinas de bajo peso molecular se encontró en los epitelios branquiales y en otros tejidos que en vertebrados superiores expresan vimentina, como el endotelio de los vasos y células musculares. Los resultados obtenidos demuestran

que existe una gran diversidad de elementos en el citoesqueleto de las branquias larvales de anuros.

El desarrollo de las branquias de anfibios es un excelente modelo de estudio de las interacciones entre las capas germinales de los embriones. Con el objeto de analizar la capacidad de diferenciación, especificación y determinación del esbozo branquial en el estadio de botón caudal, se llevaron a cabo explantes y trasplantes en embriones de *Bufo arenarum*.

Los esbozos trasplantados desarrollaron filamentos análogos a los observados en las branquias externas e internas, incluso funcionalmente. Los explantes de endo-mesodermo fueron capaces de diferenciar tejidos branquiales típicos, en presencia de distintos ectodermos; el ectodermo presuntivo branquial en forma aislada no diferenció ninguna estructura. En los embriones explantados, el desarrollo de las branquias externas fue impedido tanto por la ausencia del ectodermo como del endo-mesodermo branquial. La diferenciación de las branquias internas solo fue afectada por la pérdida del endo-mesodermo del esbozo. Estos resultados sugieren que el ectodermo branquial presuntivo se encuentra definido en el estadio de botón caudal, pero es incapaz de diferenciar estructuras branquiales en ausencia del endo-mesodermo.

Los Factores Natriuréticos Atriales son una familia de péptidos vasodilatadores, diuréticos y natriuréticos, cuya presencia ha sido demostrada en el corazón de larvas y adultos de *Bufo arenarum*. En el presente estudio, se efectuó un análisis ultraestructural e inmunohistoquímico acerca de la presencia de FNA en las branquias internas de larvas premetamórficas.

Los resultados del estudio inmunocitoquímico indican que en el estadio II larval y subsiguientes, se encuentran células inmunorreactivas en las branquias internas. A nivel ultraestructural, se encontraron en las células claras de los filtros branquiales gránulos secretorios similares a los gránulos FNA-inmunorreactivos de

las células mioendócrinas de la misma especie. Estas observaciones permiten suponer que las hormonas cardíacas podrían jugar un rol paracrino y/o autocrino en el balance osmótico y electrolítico a nivel de las branquias internas.

PALABRAS CLAVE: *Bufo arenarum*, embriones, branquias externas, branquias internas, apoptosis, citoesqueleto, citoqueratinas, esbozos branquiales, Factores Natriuréticos Atriales.

ABSTRACT

In anuran larvae external gills are embryonic structures that regress at hatching or shortly thereafter; but internal gills are retained much longer, until metamorphosis.

The morphology of gills was studied under light microscopy in *Bufo arenarum* embryos and tadpoles. The external gills filaments originate on visceral arches 3 to 5 just before the heartbeat stage; they have a two-layered epidermis, mesenchymal cells and some capillary loops are present. These gills are covered by the operculum at the 25 stage and they finally disappear.

The four pair internal gills are located in two branchial baskets on either side of the heart; each gill consist of a branchial arch with gill tufts projecting ventrally and gill filters running dorsally. Each gill tuft is composed of a stem and numerous ramifications; it consists of an epithelial covering, connective tissue, the blood vessels and mesodermal capillaries. The gill system is supported by cartilage of the branchial arch; the afferent and efferent branchial arteries and the musculus constrictor branchialis extend beside the arches.

Although the regression of internal gills of anurans is well understood, the loss of the external gills was poorly studied.

Apoptosis is a form of naturally occurring cell death during development and it is characterised by extensive DNA fragmentation. In the present work, apoptosis was detected in the epithelium of external gills by light microscopy and using *in situ* nick end-labelling of DNA breaks. The presence and distribution of stained nuclei were frequent at 24-25 stages, but it were also present during the other embrionic stages.

An immunohistochemical assay for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) identifies cells in all active phases of the cell cycle. In this study, PCNA methodology marked cells in embryonic proliferating tissues of branchial system, during the involution of external gills. .

Epithelial apoptosis of the external gills progresses simultaneously with active proliferation of the internal gills. These results show the relevance of apoptosis at regression of external gills, when this kind of death seems to be the unique process by which cell numbers in the gill epithelium are adjusted, in order to prepare for the new respiratory system of tadpoles.

There is no information about the distribution of cytoskeletal components in the anuran gills. The aim of this work was to know the distribution of some major cytoskeletal proteins in *Bufo arenarum* gills; an immunocytochemical study was performed in external and internal gills. Actin immunoreaction was observed in epithelia and connective tissue; immunodetection to myosin was restricted to connective tissue of the internal gills. Expression of α and β tubulins was found in epithelia and ciliated cells. Vimentin immunostaining was weak in the epithelial cells and intense in the connective tissue. Immunoreaction to some small cytokeratins was observed in epithelia and other tissues that in higher vertebrates express primarily vimentin; such tissues were endothelia and certain muscle cells. It is concluded that the diversity of cytoskeleton has already been established in gills of lower vertebrates such as anuran larvae.

The development of amphibian gills is an excellent model for studying the interactions between the germ layers of embryos. In order to analyze the differentiation capacity, specification and determination stage of the branchial rudiment at tail bud stage, explants and transplants were performed in *Bufo arenarum* embryos.

Rudiments transplanted developed filaments analogous to the ones observed in external and internal gills, even functionally. Endo-mesoderm explants were able to differentiate typical branchial tissues, in presence of different ectoderm; the isolated presumptive gill ectoderm did not differentiate any structure. In the explanted embryos, development of external gills was prevented by either the absence of branchial ectoderm or the meso-endoderm. Differentiation of the internal gills was only affected by the lack of the internal layers of the rudiment. These results suggest that the presumptive branchial ectoderm is defined by the tail bud stage, but is unable to differentiate branchial structures in the absence of meso and endoderm.

Atrial Natriuretic Factors are a family of vasodilatory, diuretic and natriuretic peptides, whose existence has been demonstrated in the heart of larval and adult amphibians, including *Bufo arenarum*. In this study, an ultrastructural and immunohistochemical analysis was carried out on the presence of ANF-like substance in the internal gills of premetamorphic larval stages.

The results of immunohistochemical study indicate that, at larval II and following stages, ANF-like immunoreactive cells are seen in internal gills. At electron-microscopy level secretory granules similar to those ANF-immunoreactive granules of myoendocrine cells of the same species are seen only in clear cells of gill rakers. These observations support the hypothesis that cardiac hormones might play a paracrine and/or autocrine role in the water and electrolyte balance at internal gills level.

KEY WORDS: *Bufo arenarum*, embryos, tadpoles, gills, apoptosis, cytoskeleton, cytokeratins, gills rudiments, Atrial Natriuretic Factor.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los anfibios constituyen un grupo extremadamente diverso entre los vertebrados, capaces de habitar tanto el medio ambiente acuático como el terrestre, por lo menos en alguna etapa de su vida. La transición de un medio a otro condiciona definitivamente la morfología, fisiología y el desarrollo embrionario de estos animales.

Dentro de la clase Amphibia, la subclase Lissamphibia incluye a los anfibios actuales; estos se encuentran integrados en tres órdenes : Anura (Salientia), Urodela (Caudata) y Gymnophiona (Ápoda y Cecilias) (Fox, 1983; Shi, 2000). El orden Anura incluye la mayoría de las especies anfibias modernas; sobre unas tres mil especies vivientes de anfibias , el 85 % lo constituyen los anuros, quienes presentan una amplia distribución geográfica en todos los continentes, con excepción de la Antártida (Shi, 2000). Es en este orden donde se encuentran las mayores diferencias morfológicas y funcionales entre las larvas y los adultos; precisamente, la mayoría de los anfibios anuros pasan su vida larvaria en el medio acuático y, después de un proceso de metamorfosis claramente definido, asumen el tipo de vida terrestre.

Uno de los aspectos principales del desarrollo de los anfibios y su adaptación al medio ambiente acuático o terrestre, lo constituye la formación de órganos diferentes capaces de llevar a cabo los procesos respiratorios, exhibiendo cambios muy complejos en los mismos a lo largo de su vida embrionaria y larval. Parte de esta complejidad reside en el hecho de que casi todos los integrantes de esta clase, son capaces de utilizar simultáneamente mas de un órgano en el intercambio gaseoso, obteniendo oxígeno a partir del aire, del agua o de una combinación de ambos (Burggren y Just, 1992). Esta es una adaptación fundamental de los anfibios ya que la menor capacidad de disolución del oxígeno y el

dióxido de carbono en el agua respecto del aire, implican que un animal acuático debe ventilar, bajo las mismas condiciones, unas veintiocho veces mas que uno terrestre (Viertel y Richter, 2000).

En los anuros, el intercambio gaseoso puede ocurrir a través de distintas estructuras, tanto en la larva acuática como en el adulto terrestre: la piel, el opérculo, las branquias, los pulmones y la mucosa bucofaríngea constituyen sitios potenciales de intercambio (Fox, 1983; Pfeiffer y Asashima, 1995). La piel y los pulmones son funcionales en la mayoría de los adultos, mientras que las branquias y el opérculo son sistemas respiratorios típicamente larvales.

Si bien se han estudiado diversos aspectos fisiológicos de la respiración en larvas de anuros y urodelos (Boutilier *et al*, 1980; Boutilier, 1988; Burggren y West, 1982; Burggren y Moalli, 1984; Burggren y Just, 1992; West y Van Vliet, 1992), son pocos los trabajos existentes que analizan el desarrollo y la estructura de las branquias en anuros.

Los primeros trabajos focalizados en el desarrollo de las branquias, estaban referidos principalmente a los cambios morfológicos observados durante la embriogénesis y la metamorfosis. Entre los estudios mas antiguos, se pueden encontrar descripciones de la morfología macro y microscópica de las branquias internas en trabajos de Schulze (1889 y 1892), Marshall (1893 y 1932), Whitney (1867), Boas (1882), Maurer (1888), Naue (1890) y Clemens (1895); en ciertos casos, en las tablas de estadios embrionarios de distintas especies, se encuentran descriptos algunos aspectos anatómicos de las branquias externas (para *Rana dalmatina* ver Cambar y Marrot, 1954; para *Bufo bufo* ver Cambar y Gipouloux, 1956). En el caso de la tabla mas ampliamente difundida y utilizada de *Xenopus laevis*, se han incluido tambien algunas observaciones del desarrollo morfológico de las branquias, el opérculo y el aparato filtrante (Nieuwkoop y Faber, 1956).

En años mas recientes, se han efectuado algunos trabajos en el campo de la fisiología branquial que incluyen estudios anatómicos e histológicos de estos órganos (Gradwell, 1972 a y b; Wassersug y Rosenberg, 1979; de Saint-Aubain,

1981), y de la ultraestructura de los tejidos branquiales (Hourdy, 1974, Mc Indoe y Smith, 1984; Uchiyama *et al*, 1990 a y b; Uchiyama y Yoshizawa, 1992). Solo uno de estos estudios ultraestructurales incluye algunos aspectos morfológicos sobre la involución de las branquias externas en anuros (Michaels *et al*, 1971), mientras que algunos trabajos recientes buscan dilucidar el sistema hormonal que controla dicho proceso (Warkentin y Wassersug, 2001).

En cuanto al origen y desarrollo de los tejidos branquiales en anuros, se pueden citar las descripciones morfológicas realizadas por Huettner (1948) y Rugh (1951 y 1964), así como los trabajos experimentales llevados a cabo por Ekman (1913 y 1922), Schmidt (1937) y Raunich (1942), que permitieron dilucidar algunos aspectos inductivos de la diferenciación branquial.

IMPORTANCIA DE LAS BRANQUIAS

Se ha establecido que la importancia relativa de la piel, el opérculo, las branquias, los pulmones y la mucosa bucofaríngea en los procesos respiratorios, varía durante la ontogenia de los anfibios (Czopek, 1965; Burggren y West, 1982). A pesar de los trabajos fisiológicos realizados, aun existen controversias en cuanto a la contribución de cada una de estas estructuras en los distintos estadios embrionarios.

Frecuentemente ha sido considerado que el desarrollo secuencial de las branquias externas e internas en las larvas, provee la maquinaria necesaria para el proceso respiratorio en el medio ambiente acuático (Fox, 1983). Lovtrup y Pigon (1968) demostraron en anuros que una alta tensión de oxígeno en el agua provoca una reducción en el tamaño de las branquias y en el número de filamentos, mientras que, ante una alta tensión de CO₂, las branquias incrementan su tamaño, el número de filamentos, el volumen celular y la cantidad de figuras mitóticas, debido a una activa proliferación celular. También se ha comprobado, a través de análisis ultraestructurales, que las branquias constituyen los sitios mas activos de

intercambio gaseoso en algunos hylidos como *Litoria ewingii* (McIndoe y Smith, 1984). Sin embargo, algunos autores han señalado en urodelos que las branquias probablemente no son esenciales para la captación de oxígeno, ya que larvas en que se les extirparon estos órganos fueron tan competentes como los individuos normales (Boell *et al*, 1963).

En anuros, tomando en cuenta la densidad capilar en renacuajos de *Rana esculenta* o midiendo la captación de oxígeno en los renacuajos de *Rana catesbeiana*, algunos autores propusieron que la piel es el principal intercambiador gaseoso larvario (Strawinski, 1956; Burggren y West, 1982); sin embargo, de Saint-Aubain (1981) sugirió que el intercambio cutáneo no es importante en las larvas de *Rana temporaria* y *Bufo bufo*, debido a la escasa vascularización que presenta la piel larval.

También se han realizado diversos análisis acerca de la intervención de las branquias en otros procesos fisiológicos y se ha señalado que las branquias pueden jugar un rol muy importante en los procesos de regulación iónica del organismo (Alvarado y Moody, 1970; Hourdry, 1974). Se ha sugerido que la cámara branquial es el mayor e incluso quizás único sitio de transporte activo de Na^+ y Cl^- (Dietz y Alvarado, 1974) y el principal lugar de excreción de amonio durante la vida larval (Maetz, 1972), aún tomando en cuenta que también la piel de las larvas es permeable a los gases, al agua y los iones (Bentley y Baldwin, 1980).

En larvas de *Rana catesbeiana* (Boonkoom y Alvarado, 1971) y de *Calyptocephallela caudiverbera* (Gonzales *et al*, 1979) se encontró que las branquias presentaban una alta actividad de Na-K-ATPasa, mientras que los ensayos fisiológicos de larvas mantenidas en agua pobre en iones demostraron un incremento en su capacidad para el transporte de los mismos a través de los filamentos branquiales y en la actividad de la Na-K-ATPasa (Boonkoom y Alvarado, 1971; Dietz y Alvarado, 1974).

OBJETIVOS GENERALES

Debido a los diversos roles funcionales que cumplen las branquias durante la vida acuática de los anfibios, así como los aspectos peculiares de su origen múltiple y de los eventos de diferenciación y regresión implicados en el desarrollo secuencial de los filamentos externos e internos, las branquias constituyen un modelo interesante de estudio de la organogénesis.

Si bien se han realizado estudios fisiológicos en cuanto a su rol en la respiración y los aspectos endocrinológicos del proceso de degeneración que sufren durante la metamorfosis, han sido escasos los trabajos encarados para aclarar su histología, y ultraestructura, los procesos implicados en la morfogénesis de las mismas, así como su participación en procesos de osmorregulación. Además, tanto el desarrollo de las branquias externas e internas, así como la regresión de las primeras durante el pasaje de la vida embrionaria a larval, no han sido estudiadas, hasta el momento, mediante la aplicación de técnicas contemporáneas como las de inmunocitoquímica.

Bufo arenarum (Anura, Bufonidae) es una especie ampliamente distribuida en la Argentina, sobre la cual se han realizado numerosos trabajos tanto en adultos como en embriones y larvas, pero ninguno encarando el estudio de alguno de los aspectos mencionados durante el desarrollo de las branquias.

Los objetivos del presente trabajo son establecer el patrón de diferenciación de las estructuras histológicas y citoesqueléticas durante la organogénesis de las branquias externas e internas, conocer algunos de los eventos inductivos, de proliferación y muerte celular involucrados a lo largo de este desarrollo, y proveer algunas bases citológicas acerca del eventual rol de las branquias en los procesos de regulación osmótica en las larvas de *Bufo arenarum*.

Capítulo 1

MORFOLOGIA Y DIFERENCIACION HISTOLOGICA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS E INTERNAS

INTRODUCCION

ORIGEN DE LAS BRANQUIAS: ORGANOGÉNESIS DE LAS BOLSAS FARINGEAS

En vertebrados, la diferenciación del tubo digestivo embrionario es acompañada por la formación de diversas estructuras, no siempre con implicancias en los procesos digestivos. De la porción anterior de este tubo o intestino embrionario, la faringe, se desarrollan las bolsas faríngeas, también conocidas como viscerales o branquiales, que darán origen a diversos órganos tanto en las larvas como en los adultos .

Durante la embriogénesis de los anfibios, en la fases que siguen al cierre del tubo neural, las paredes laterales de la cavidad faríngea, de origen endodérmico, se evaginan transversalmente en dirección a la capa interna o sensorial del ectodermo; estas proyecciones de la faringe conforman las bolsas faringeas o viscerales, que se encuentran ordenadas en sentido antero posterior. Paralelamente, el ectodermo adyacente se invagina hacia la faringe formando los surcos viscerales, y al promediar el estadio de botón caudal, el endodermo faríngeo y el ectodermo se contactan dando lugar a las membranas viscerales bilaminares. Estas membranas se perforan y dan lugar a las hendiduras o fisuras branquiales, que establecen en la larva una comunicación entre el medio externo y la cavidad faríngea (Karp y Berrill, 1981; Hausen y Riebesell, 1991) (fig. 1).

En los anuros, los surcos viscerales no se desarrollan simultáneamente sino mas bien secuencialmente (Gilchrist, 1968). El primero (hiomandibular) aparece en el estadio 15 o 16 (rotación y tubo neural) en la parte anterior, mientras que el quinto surco aparece al mismo tiempo en el margen posterior del área branquial. A continuación se visualizan el segundo y tercer surco, y posteriormente el cuarto y

quinto (Gilchrist, 1968); en algunos anfibios ha sido descripta la presencia de un sexto surco rudimentario (Huettnner, 1948).

Si bien las bolsas viscerales están constituidas originalmente por seis pares, el primero no llega a contactar el ectodermo y forma un divertículo ciego en la pared de la faringe, que posteriormente se integrará al oído medio conformando la trompa de Eustaquio; por lo tanto, si bien existen seis pares de hendiduras potenciales, la primera nunca es funcional en anfibios. Asimismo, aunque se ha observado en algunos anuros la presencia de un sexto par de hendiduras viscerales, existen casos como el de *Rana sylvatica* en que no ha sido identificado, probablemente por ser abortivo (Huettnner, 1948).

Las bolsas faríngeas endodérmicas son las iniciadoras de los procesos inductivos que se verifican en la región branquial; los surcos branquiales ectodérmicos son inducidos por las bolsas al alcanzar estas la capa interna o sensorial de la epidermis, atravesando el mesodermo intermedio (Balinsky, 1948; Karp y Berrill, 1981). También durante este proceso de organogénesis comienza la formación de un esqueleto visceral constituido por seis arcos, establecidos entre las bolsas faríngeas; el primero (I) o mandibular se ubica por delante de la primer bolsa faríngea y del surco visceral correspondiente (fig.1). El siguiente, segundo arco visceral (II) o hioideo, se encuentra entre la primera y segunda bolsa faríngea, mientras que en las posiciones sucesivas se ubican los arcos viscerales III, IV, V y VI, los que también son denominados arcos branquiales.

Cada arco está constituido en un principio por una masa de células mesodérmicas, cubierta por una lámina externa ectodérmica y una interna endodérmica. Este esqueleto visceral es originado a partir de células de las crestas neurales craneales (de origen ectodérmico), que migran desde la zona dorsal del embrión (el tubo neural anterior) formando lengüetas entre las bolsas faríngeas adyacentes. En estadios más avanzados, estos arcos pasarán por un proceso de condricificación del mesénquima de las crestas neurales, en la misma posición en que se encontraban las masas de células migrantes. También durante

este proceso se verifica un mecanismo de inducción por parte de las bolsas faríngeas endodérmicas, ya que sin su presencia el mesénquima no se condrica y no se completa la formación del cartílago de los arcos (Balinsky, 1948; Karp y Berrill, 1981; Hausen y Riebesell, 1991).

El grado de desarrollo y el destino de los seis surcos, arcos y bolsas faríngeas es diferente en los distintos vertebrados. En los embriones de anfibios generalmente se ha descrito la presencia de cinco pares de surcos viscerales, de los cuales solo los pares II a V participan en el desarrollo de las estructuras branquiales. Entre los arcos viscerales, los pares III a VI dan lugar a los arcos branquiales 1-4 y al sistema circulatorio del área branquial, conformado por los arcos aórticos o arterias branquiales (Tabla 1).

ECTODERMO	MESODERMO	ENDODERMO
	arcos visceral y aórtico I	
	(maxilar y mandibular)	
surco visceral I	hendidura visceral I	bolsa visceral I
	(hiomandibular)	
	arcos visceral y aórtico II	
	(hioideo; opérculo)	
surco visceral II	Hendidura visceral II	bolsa visceral II
	(primera branquial)	
	arcos visceral y aórtico III	
	(carótida y branquias I)	
surco visceral III	Hendidura visceral III	bolsa visceral III
	(segunda branquial)	
	arcos visceral y aórtico IV	
	(sistémico y branquias II)	
surco visceral IV	Hendidura visceral IV	bolsa visceral IV
	(tercera branquial)	
	arcos visceral y aórtico V	
	(branquias III)	
surco visceral V	Hendidura visceral V	bolsa visceral V
	(cuarta branquial)	
	arcos visceral y aórtico VI	
	(vestigial)	
	(pulmocutaneo y branquias rudimentarias IV)	
surco visceral VI	hendidura visceral VI	bolsa visceral VI
(vestigial)	(vestigial)	
	(quinta branquial)	

TABLA 1: Derivados faríngeos, tomado de Rugh (1964)

Por otra parte, en los anfibios, los arcos viscerales I y II participan en la formación del esqueleto de la cabeza, mientras que la primer bolsa faríngea interviene en la formación del oído medio; otros órganos originados a partir de las

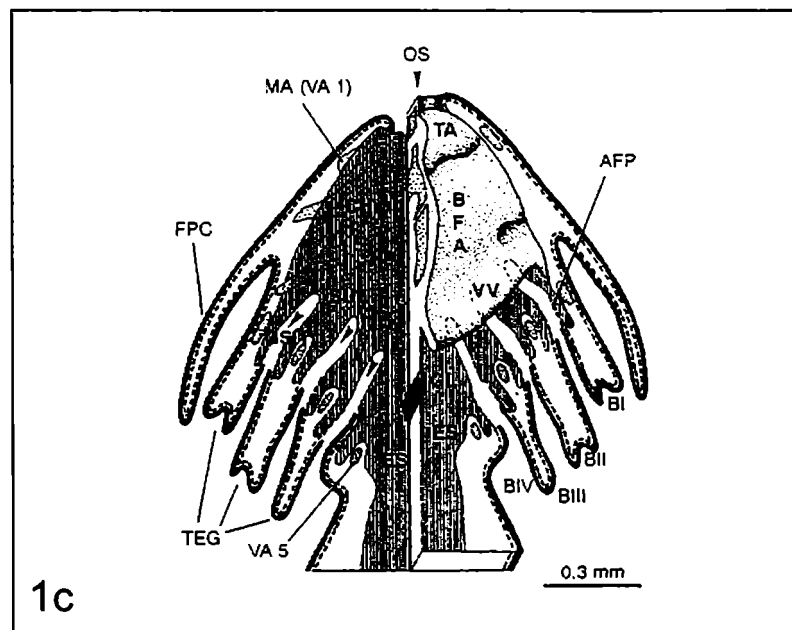
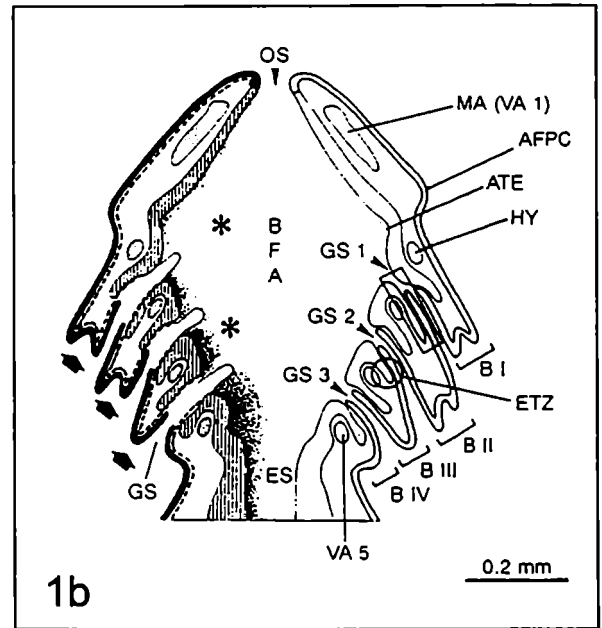
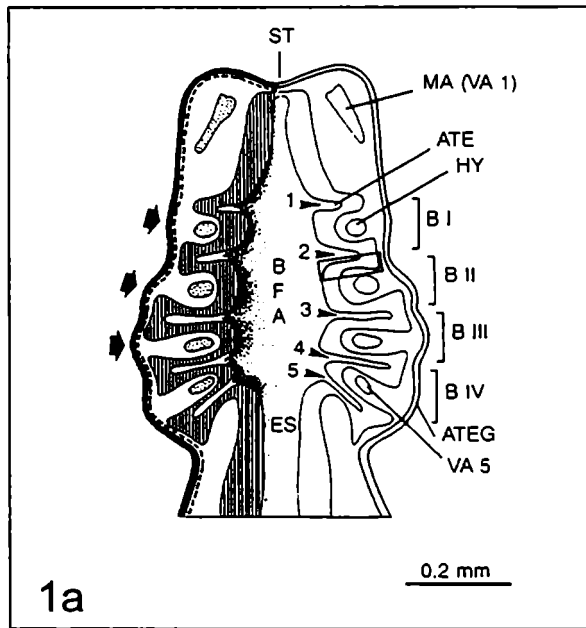
bolsas faríngeas son el timo, las glándulas paratiroides, y los cuerpos ultimobranquiales (Fox, 1983).

BRANQUIAS EXTERNAS

Poco después del estadio de respuesta muscular, en los embriones de anuros comienza el desarrollo de las branquias externas; estas consisten en penachos de filamentos recubiertos de ectodermo que se originan como proyecciones del mesodermo de la región lateroventral de los arcos viscerales tercero, cuarto y quinto (branquiales 1- 3) (Huettner, 1948; Michaels *et al*, 1971; Hourdry, 1974; Weichert y Presch, 1981; Fox, 1983; Viertel y Richter, 2000) (fig 1b). En algunos anuros, el sexto arco visceral puede dar origen a un pequeño filamento, pero éste generalmente no es funcional (Rugh, 1964).

Los filamentos branquiales externos están revestidos por un epitelio ciliado, similar al que recubre el resto del cuerpo, e internamente presentan tejido conectivo y vasos capilares de origen mesodérmico (Viertel y Richter, 2000); en *Rana pipiens*, el interior de los filamentos contiene células mesenquimáticas, fibras de colágeno y vasos capilares (Michaels *et al*, 1971), mientras que en *Rana cancrivora* se ha descrito que estas protrusiones epidérmicas presentan además de tejido conectivo y vasos sanguíneos, células musculares (Uchiyama y Yoshizawa, 1992).

En los embriones de anuros las branquias externas presentan una breve existencia y son reemplazadas en pocos días por las branquias internas, a diferencia de los urodelos en que las primeras persisten hasta la metamorfosis. Cuando las branquias externas han completado su desarrollo y alcanzado su máxima longitud, el arco hioideo origina un pliegue tisular, el opérculo, que no es homólogo de la misma estructura presente en los peces (Romer, 1973); este pliegue opercular crece delante de las branquias y en sentido posterior, cubriendo los filamentos y las hendiduras branquiales y se fusiona a la piel del abdomen.



El período de tiempo que dura el desarrollo y permanencia de las branquias externas en los embriones de anuros varía notablemente entre las distintas familias e incluso entre especies cercanas. En los embriones de *Xenopus laevis* los filamentos branquiales aparecen en el estadio 39 (Niewkoop y Faber, 1956), aproximadamente a las 54 hs de vida; alcanzan el máximo de longitud en el estadio 41 (76 hs) y se reducen a partir del estadio 44. A partir del estadio 46 son recubiertos por el opérculo y no son visibles, aunque persisten restos de estos filamentos hasta el estadio 53.

En *Rana dalmatina*, las branquias externas pueden ser observadas a partir del estadio 23 (Cambar y Marrot, 1954), cuando el embrión tiene 4 días de vida; los filamentos del lado derecho desaparecen en el estadio 31 (8 días) y los del lado izquierdo en el estadio 32 (9 días). En *Rana cancrivora*, los filamentos se hacen visibles en el estadio 21 (Witschi, 1956), a las 27 hs de vida; la máxima longitud la alcanzan en el estadio 23 (51 hs de vida). Poco después comienzan a disminuir de tamaño y son cubiertas por el opérculo en el estadio 25 (96 hs de vida).

En *Bufo bufo* los filamentos externos aparecen en el estadio III₄ (Cambar y Gipouloux, 1956), alrededor de los 4 días de vida; también su desaparición comienza por el lado derecho cuando la larva ha alcanzado el estadio III₉ (8 días 5 hs de vida) y poco después por el lado izquierdo en el estadio III₁₀ (8 días 15 hs de vida).

Irrigación de las branquias externas

Los embriones de anfibios presentan un sistema arterial que consiste en una aorta dorsal par, ubicada sobre la faringe, que se fusiona en una sola en la parte posterior del cuerpo. La circulación sistémica de la sangre en el embrión comienza cuando las branquias son meras protuberancias y los arcos aórticos aún son continuos desde la aorta ventral a la dorsal. Poco después de comenzar a nadar, cuando las branquias crecen y se ramifican, se desarrolla una red vascular dentro

de los filamentos, que se originan a partir de los arcos aórticos; los vasos que entran desde la aorta ventral hacia las branquias se denominan “aferentes”, mientras que los que salen hacia la aorta dorsal constituyen los vasos branquiales “eferentes” (Rugh, 1951, 1964; Gilchrist, 1968; Mc Indoe y Smith, 1984) (fig. 2 y 3).

Como el embrión aún no es muy activo, la necesidad de oxígeno es baja; con el aumento de la actividad natatoria, la provisión de oxígeno aumenta por la apertura de la boca y de las hendiduras branquiales. En primer lugar se perforan las fisuras tercera y cuarta, seguidas luego por la segunda y quinta; entonces, el agua penetra por la boca y sale a través de las hendiduras branquiales pasando cerca de los “loops” capilares que atraviesan los filamentos externos, donde tiene lugar la oxigenación de la sangre. Estos vasos se unen a los arcos aórticos, a través de los que surge la sangre que irrigará el cuerpo del embrión (Rugh, 1968) (fig. 4a). Los movimientos ondulatorios de los filamentos branquiales y la acción ciliar de las células epidérmicas contribuyen a asegurar la renovación constante del agua que baña las branquias, posibilitando el intercambio gaseoso a través de ese epitelio (Weichert y Presch, 1981).

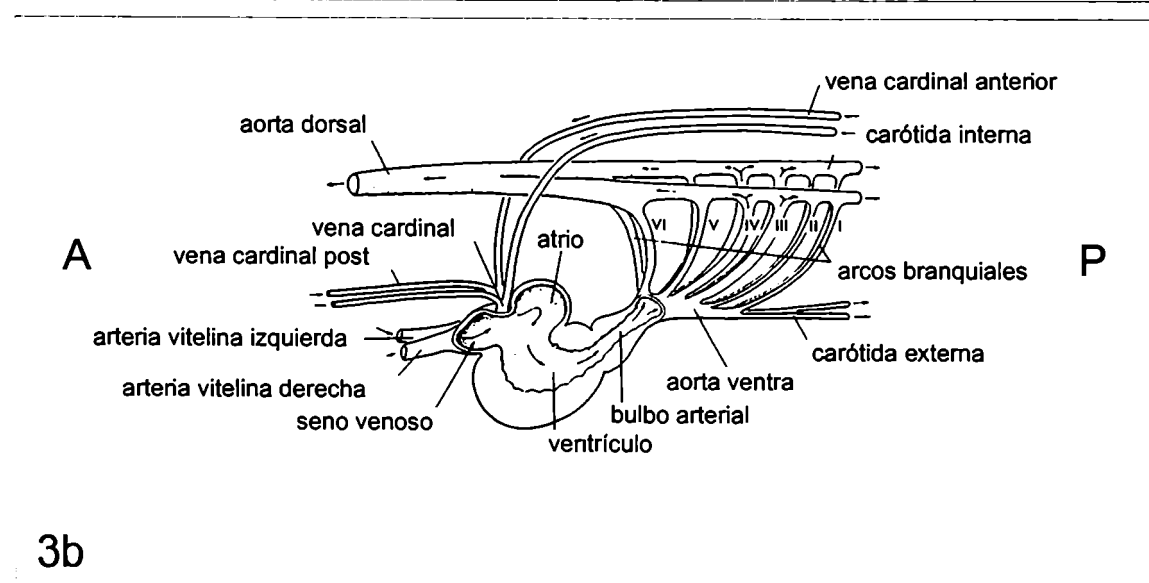
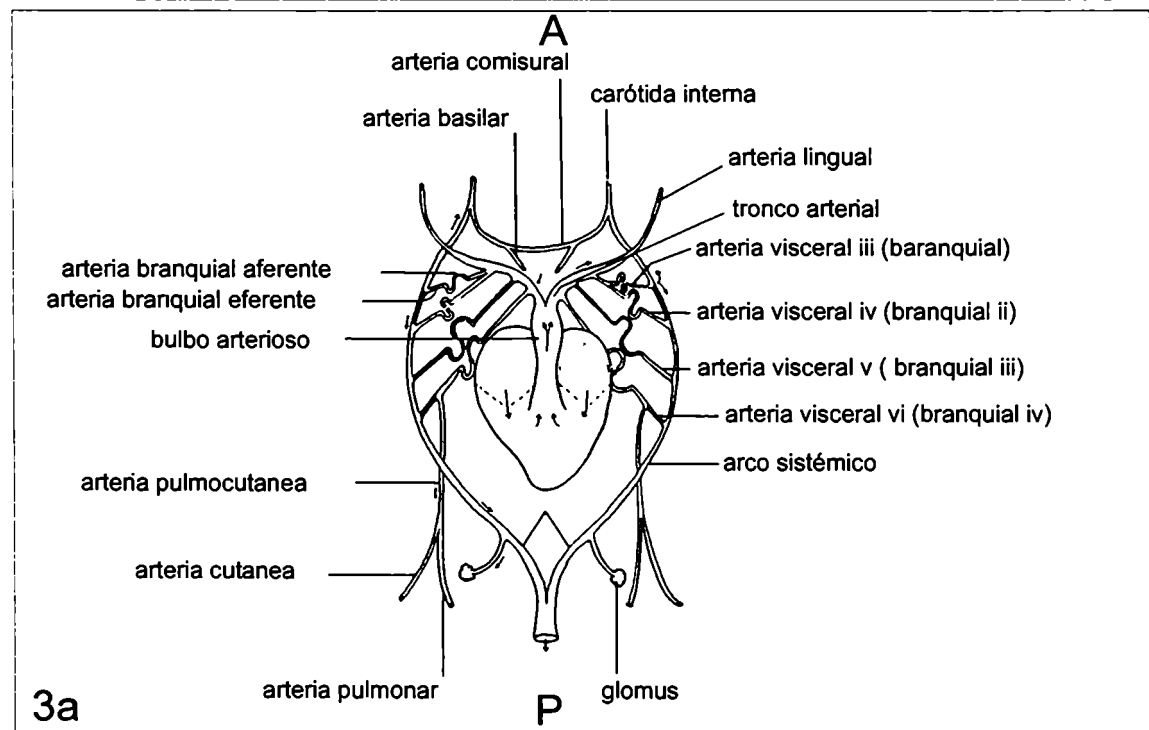
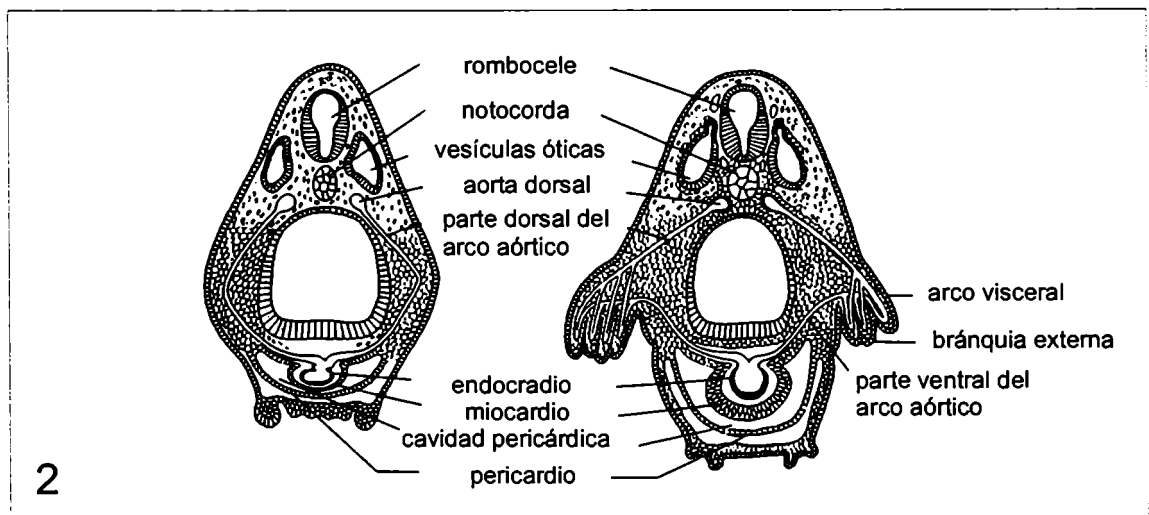
BRANQUIAS INTERNAS

Contemporáneamente al crecimiento del pliegue opercular, las branquias externas se reducen de tamaño y comienza el desarrollo de las branquias internas sobre la porción ventral de los arcos branquiales, por debajo de las anteriores; finalmente el opérculo cubre por completo las branquias y se fusiona con la pared del cuerpo formando las cámaras branquiales u operculares, dejando sólo una abertura que comunica con el exterior en el lado izquierdo del cuerpo, el espiráculo (Rugh, 1951; Gilchrist, 1968; Fox, 1983) . Ambas cámaras están comunicadas ventralmente al corazón por el canal opercular; las branquias externas degeneran

por completo, mientras prosigue el desarrollo de las internas, las que permanecerán funcionales durante el resto de la vida larval.

Las branquias internas se originan a partir del endodermo de las bolsas faríngeas (Gilchrist, 1968) y de la zona de transición ecto-endodérmica, donde células de la capa sensorial de la epidermis penetran el endodermo (Viertel y Richter, 2000) (fig. 1b). En un principio estas branquias se presentan como una doble hilera de filamentos en la parte posterior del tercer, cuarto y quinto arcos viscerales (primero, segundo y tercero branquiales) (Huettnner, 1948), y en la forma de una hilera simple en el sexto arco visceral (cuarto branquial), que es el de menor tamaño. La parte dorsal de los arcos es revestida por unas papilas aserradas, los “filtros branquiales”, que posibilitan la filtración de detritus del agua que penetra en la cavidad branquial; el área ventral de los arcos origina las estructuras respiratorias, cuya denominación varía según los autores : las “crestas branquiales” (Gradwell, 1972a; McIndoe y Smith, 1984) o los “filamentos branquiales” (Wassersug, 1980; de Saint-Aubain, 1981). Mientras que el endodermo faríngeo es el mayor componente de los filtros, el ectodermo y el mesodermo de los capilares predominan en los filamentos branquiales (Viertel y Richter, 2000). Una vez diferenciados, los filtros branquiales están compuestos por una doble capa de epitelio, que contiene tejido conectivo y el esqueleto visceral; los filamentos o crestas también están formados por un epitelio, tejido conectivo, algunas células endodérmicas aisladas y capilares sanguíneos. Las cámaras branquiales se encuentran separadas de la faringe por el velo ventral y los velos dorsales, originados a partir de pliegues de la pared de la faringe (Huettnner, 1948).

El esqueleto de las branquias esta conformado por una estructura que algunos autores han denominado como “cestas branquiales” (Gradwell, 1972a; McIndoe y Smith, 1984; Uchiyama y Yoshizawa, 1990) y que forma parte del esqueleto hiobranquial (Cannatella, 2000) (fig 5); cada cesta branquial esta compuesta por una placa hipobranquial subtriangular y los cuatro ceratobranquiales, entre los cuales se alojan tres hendiduras. Estos arcos estas



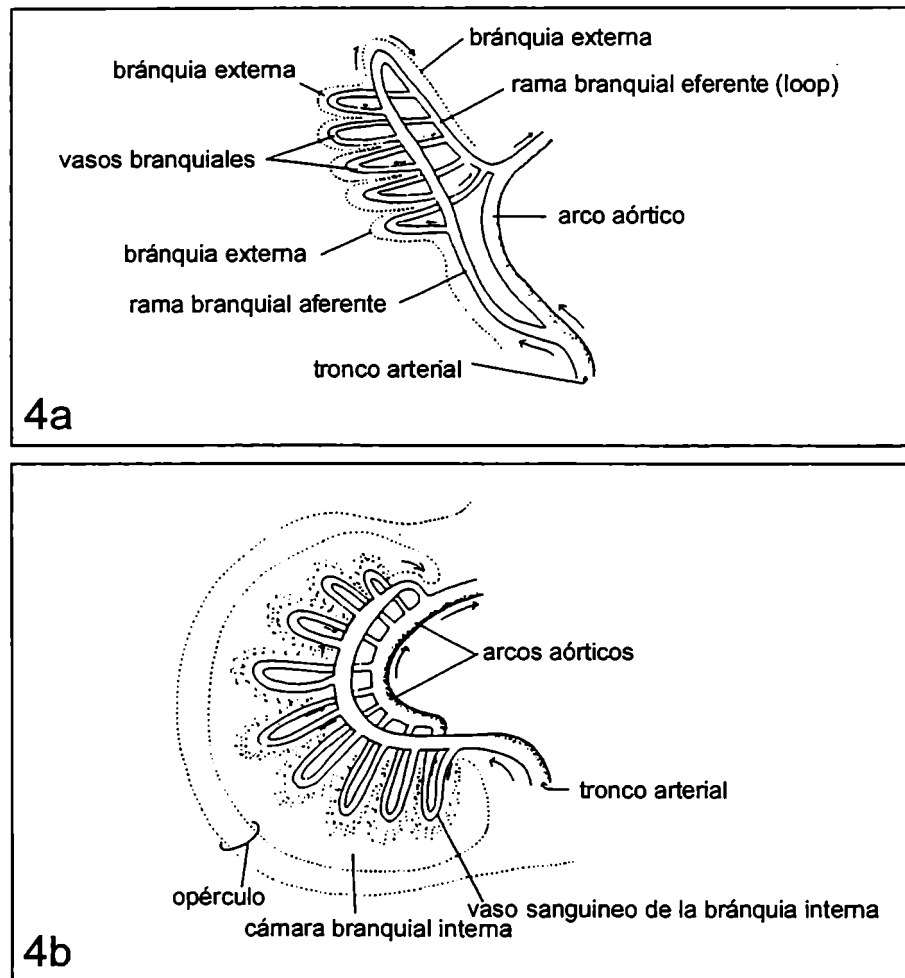


Figura 4: Esquemas que muestran la circulación sanguínea en un embrión ideal. Adaptado de Rugh (1964). a) en una bránquia externa; b) en una bránquia interna.

fusionados en los extremos proximales y distales, los que son denominados comisuras proximales y distales respectivamente; las espículas son procesos cartilaginosos que surgen dorsal y posteriormente desde los ceratobranquiales para soportar el velo ventral.

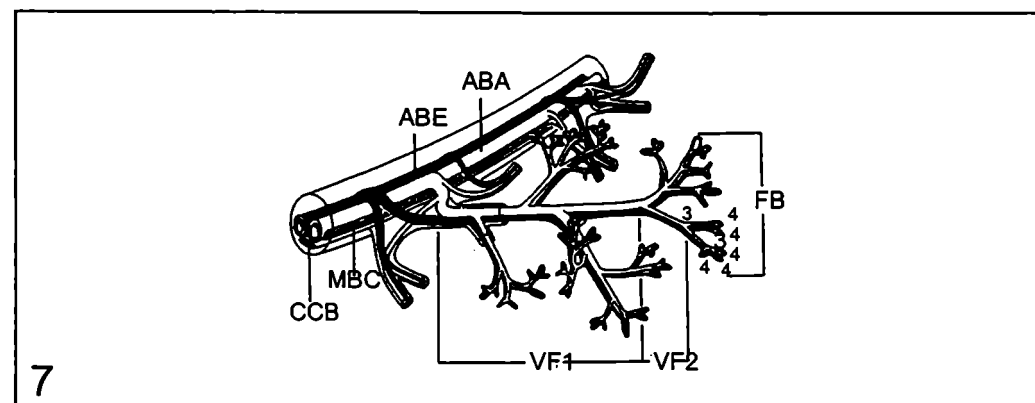
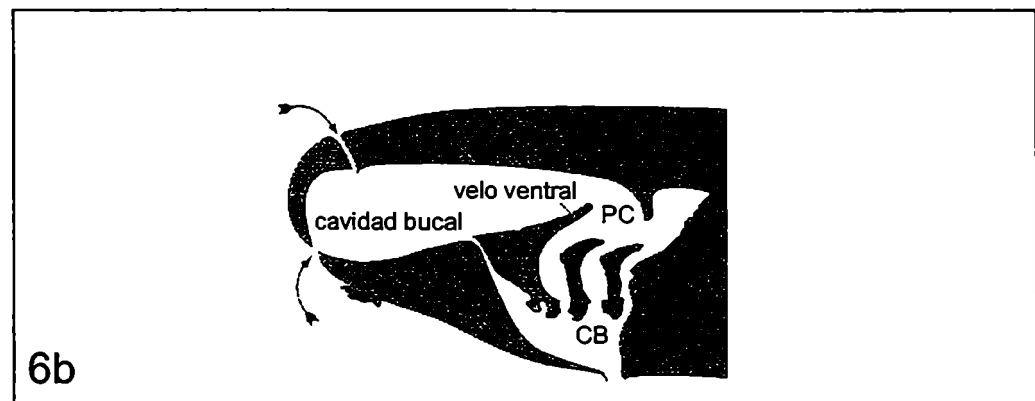
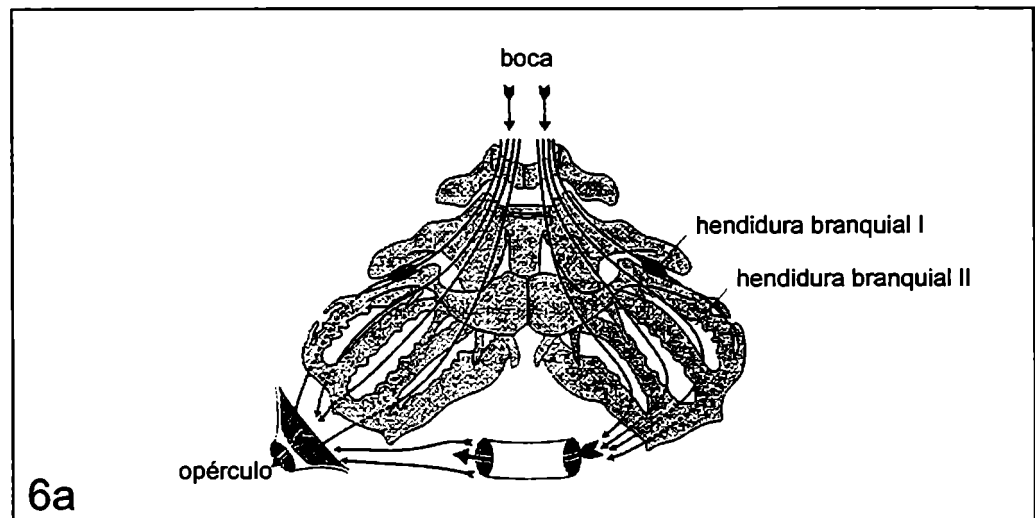
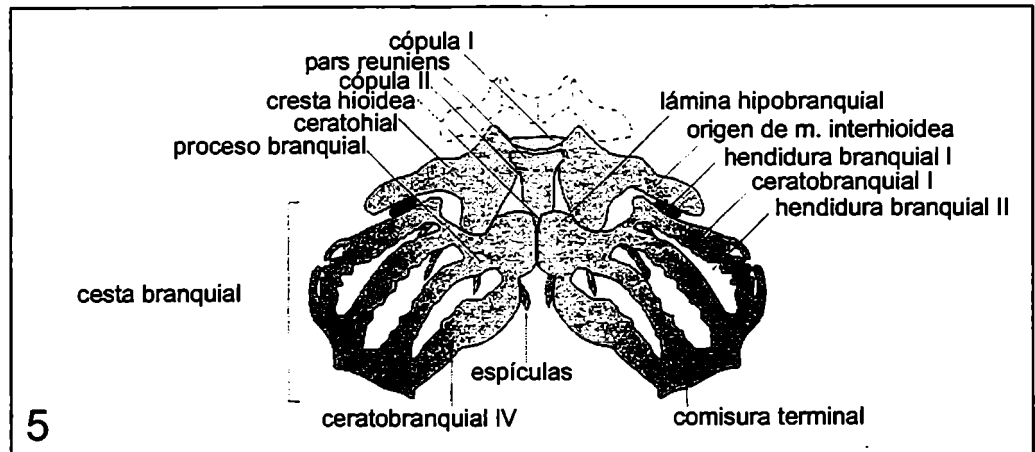
El agua entra por la boca de los renacuajos, pasa desde la faringe a la cámara branquial, donde atraviesa las hendiduras o fisuras branquiales y se produce el intercambio gaseoso en los filamentos; el agua de ambas cámaras es expelida a través del espiráculo (Weichert y Presch, 1981) (fig. 6). Las larvas de anuros emplean movimientos dorsoventrales del piso de la cavidad oral para ventilar las cámaras branquiales, inspirando agua a través de la boca y empujándola a través de la cavidad branquial (Gradwell, 1972b); este mecanismo es homólogo al observado en los peces. La regulación de la ventilación branquial es extremadamente mas sofisticada y compleja que la observada en la ventilación pulmonar de los anuros adultos (Burggren y Just, 1992).

El desarrollo de las branquias internas es sumamente variable entre distintas especies de anuros, y de los trabajos realizados hasta el momento no se ha encontrado una clara correlación con la posición filogenética ni con las condiciones del medio ambiente (Strawinski, 1956; Atkinson y Just, 1975; Gradwell, 1969, 1972a; de Saint-Aubain, 1982; McIndoe y Smith, 1984; Uchiyama *et al*, 1990; Burggren y Just, 1992). Generalmente los ranidos presentan branquias altamente desarrolladas y con una extensa vascularización (Gradwell, 1972a), mientras que las larvas de pipidos e hylidos tienen un aparato branquial reducido especializado en el filtrado de partículas alimenticias mas que en el intercambio gaseoso (Wassersug y Rosenberg, 1979; Wassersug, 1980). En contraste con el resto de las larvas de anuros, *Xenopus laevis* no desarrolla branquias internas especializadas en intercambio gaseoso, sino que presenta una red vascular muy elaborada que irriga al aparato filtrante, lo que posibilita tanto una función respiratoria como alimenticia (Fox, 1983).

Las branquias internas en *Discoglossus pictus* son funcionales desde el estadio I larval hasta el estadio XVIII (Hourdry, 1974) en que los miembros anteriores son visibles claramente bajo la piel; los filamentos de estas branquias están cubiertos por un epitelio bi-estratificado que encierra numerosos capilares. A nivel ultraestructural, este epitelio presenta dos tipos celulares: células cuboides tipo A, con un citoplasma reducido a una fina capa perinuclear, y células tipo B, con un gran área infranuclear y numerosas mitocondrias y vesículas. En algunas partes de los filamentos internos, el epitelio bi-estratificado es muy fino y consiste solo de células tipo A, cumpliendo una función respiratoria. Se ha sugerido que las células tipo B posiblemente cumplan una función similar a las células de cloruros de los teleósteos (Fox, 1983). Las branquias internas en esta especie comienzan su involución desde el estadio XIX, en el comienzo del clímax, y han desaparecido por completo al final de esta etapa, en el estadio XXIV.

En el caso de *Rana catesbeiana*, se ha observado que los filamentos branquiales se encuentran revestidos por un epitelio simple escamoso, con numerosos granulocitos eosinófilos tanto en el epitelio como en el tejido conectivo subepitelial (Kusakabe y Kawakami, 1992); no se han observado diferencias histológicas en las branquias internas desde fases tempranas larvales, el estadio III, hasta el avanzado estadio XXII. Después del estadio XXIII, las branquias comienzan a degenerar, y en el estadio XXIV, los filamentos han desaparecido por completo (Atkinson y Just, 1975).

En *Rana cancrivora*, el análisis histológico y ultraestructural mostró que los filtros branquiales se encuentran recubiertos por un epitelio bilaminar de células cilíndricas y pavimentosas escamosas, que presenta en algunos casos células mucosas. En cambio, el epitelio que bordea los arcos branquiales y los filamentos respiratorios está compuesto por una bi o multicapa de células, con cuatro tipos celulares diferentes: células pavimentosas, tanto escamosas como cuboides; células MR ("mitochondria-rich cells"), correspondientes a células eosinófilas



observadas en el microscopio óptico, células escamosas basales y células mucosas (Uchiyama *et al*, 1990 b).

Algunos autores han propuesto que los términos branquias “externas” e “internas” no reflejan la verdadera posición de ellas en los embriones: las branquias internas comienzan su desarrollo previamente al cierre del opérculo, por lo que todas se encuentran en una ubicación externa. Viertel (1991) propuso que los términos branquias “transitorias” y “persistentes” serían mas adecuados para la descripción de las mismas. En el presente trabajo hemos optado por la denominación clásica ya que es la mas frecuentemente utilizada en la bibliografía.

Anatomía vascular de las Branquias Internas

En las larvas premetamórficas de anuros la sangre es distribuida desde el tronco arterioso que sale del corazón hacia unas cortas extensiones anteriores, las aortas ventrales, a partir de las cuales se originan las arterias aferentes branquiales que se extienden a lo largo de los arcos branquiales; luego de oxigenarse en los filamentos respiratorios, la sangre es colectada en cuatro arterias eferentes branquiales, las que continúan en las carótidas internas anteriores y en las aortas dorsales pares posteriores (Rugh, 1964; Gradwell, 1972; Mc Indoe y Smith, 1984) (fig. 3 y 4). Los filamentos respiratorios están atravesados por una amplia red de vasos capilares; cada filamento contiene un par de vasos primarios, originados a partir de las arterias aferentes y eferentes, que conforman el eje del filamento y se ramifican en vasos secundarios aferentes y eferentes, que se conectan entre sí a través de uno o varios “loops” capilares. (fig. 7). En algunas especies existen evidencias de conexiones directas o anastomosis entre las arterias branquiales aferentes y eferentes (de Saint-Aubain, 1981; Mc Indoe y Smith, 1984). Se ha propuesto que estas anastomosis permiten mantener el flujo sanguíneo durante la degeneración de los filamentos branquiales. La

vasoconstricción de las anastomosis podría regular la cantidad de sangre que fluye a través de los capilares e intervenir de esta manera en el intercambio gaseoso.

Inervación de las Branquias Internas

La inervación del área branquial se desarrolla a partir de los nervios craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago). El primero, inerva la región hiomandibular, el IX, los arcos viscerales II y III, mientras que el último, el vago, inerva a los arcos IV y V (Rugh, 1964).

OBJETIVOS

Los estudios relacionados con el desarrollo y la diferenciación de branquias en anuros han estado sentados principalmente en dos familias: ránidos y pípidos. Entre los primeros, numerosos trabajos han sido realizados en *Rana catesbeiana* debido a la ventaja de presentar renacuajos de gran tamaño y a la facilidad para obtener los embriones en el laboratorio. Entre los pípidos, el análisis se ha centrado en *Xenopus laevis*, especie ampliamente utilizada en estudios de biología del desarrollo. Por otra parte, prácticamente no existen trabajos que analicen la estructura branquial en embriones y larvas de la familia bufonidae, grupo cosmopolita con especies distribuídas en todo el mundo; particularmente en *Bufo arenarum*, no existe ningun trabajo al respecto.

Como una precondition para llevar a cabo un trabajo analítico sobre el desarrollo de un órgano, una estructura de orientación debe ser establecida a través de la división del proceso embriológico en una sucesión de fases, cada una definida por algunos aspectos morfológicos. Por lo tanto, en primer lugar se realizó

un estudio histológico de las distintas etapas involucradas en el desarrollo de las branquias, desde la aparición de los esbozos embrionarios de las branquias externas hasta la completa diferenciación de las branquias internas en estadios premetamórficos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Obtención y Mantenimiento de Animales Adultos

Los ejemplares adultos de *Bufo arenarum* fueron capturados en los alrededores de la ciudad de Buenos Aires, entre los meses de Abril y Octubre. Los mismos fueron mantenidos en recipientes de madera con tierra, en condiciones de oscuridad, humedad y temperatura adecuadas a un período de hibernación.

Obtención y Mantenimiento de Embriones

Las hembras de *Bufo arenarum* fueron aclimatadas a una temperatura de 25°C con un fotoperíodo de 12h. de luz durante 48h., antes de ser inducidas a ovular con inyecciones de suspensiones de hipófisis homólogas, almacenadas según Pisanó (1957), o con 2500 u.i. de gonadotrofina coriónica humana (Endocorion, Elea, Buenos Aires). Apenas comenzada la oviposición fueron desmeduladas, las ristas de ovocitos fueron extraídas del ovisaco mediante una incisión abdominal y colocadas en cápsulas de Petri humedecidas con solución de Holtfreter (3,5 g NaCl + 0,05 g KCl + 0,2 g NaHCO₃ + 1000 ml agua destilada) pH 7,2, donde fueron

fertilizadas *in vitro* con una suspensión de espermatozoides. Esta suspensión se preparó a partir de un macerado de testículos, previa comprobación de la movilidad y motilidad de los espermatozoides bajo el microscopio óptico.

Los embriones obtenidos fueron mantenidos a temperatura ambiente en cápsulas de Petri (200 ml) y solución de Holtfreter, hasta la aparición de los esbozos de los miembros posteriores. En este estadio fueron transferidos a acuarios (2 l) con la misma solución; el medio fue renovado semanalmente y las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida *ad libitum*.

Selección de Estadios Embrionarios y Larvales

Para el seguimiento de los cambios ontogenéticos en *Bufo arenarum* y la selección de los estadios de interés en este estudio, fueron utilizadas dos tablas:

- * la primera comprende los estadios embrionarios, abarcando desde el momento de fecundación del ovocito hasta que el opérculo embrionario se ha completado (Del Conte y Sirlin, 1952);
- * la segunda tabla continúa a la anterior, abarcando los estadios larvales, a partir de la presencia de los esbozos de los miembros posteriores y hasta completar el proceso metamórfico (Martín *et al*, 1985).

Los estadios analizados en este trabajo son los que se detallan a continuación; entre paréntesis se han colocado los estadios equivalentes de la tabla de Gosner (1960), que describe la ontogenia de los anuros en general.

Embrionarios

- Estadio 17 (17): Brote caudal, 76 horas.
- Estadio 18 (18): Respuesta muscular, 4 días, 3.5 mm.
- Estadio 19 (19): Latido cardíaco, 5 días, 5 mm.
- Estadio 20 (20): Circulación branquial, 5 1/2 días, 5.5 mm.
- Estadio 21(21): Boca abierta, 6 1/2 días, 7 mm.

- Estadio 22 (22): Circulación en la aleta de la cola, 7 1/2 días, 7.5 mm.
- Estadio 23 (23): Pliegue opercular, 8 días, 8 mm.
- Estadio 24 (24): Opérculo cerrado en la derecha, 9 1/2 días, 9 mm.
- Estadio 25 (25): Opérculo completo, 11 días, 10 mm.

Larvales

Estadios Premetamórficos

- Estadio I (26): Esbozo visible de miembros posteriores. Diámetro largo-ancho del esbozo aproximadamente igual. Boca larval con la fórmula dental 1/1-1/3. Pico con dientes finos pero bien netos. Papilas laterales en el ángulo bucal, que se dirigen hacia fuera, siendo así partes de la pared lateral del vestíbulo bucal.
- Estadio II (27): El esbozo de miembros posteriores crece en longitud; el largo duplica el ancho.
- Estadio III (28): La longitud de miembros posteriores es más o menos igual a su ancho, tomando así un aspecto globoso. Los cromatóforos se disponen en forma más compacta en la región dorso-lateral del miembro en desarrollo, quedando la región ventral menos pigmentada.
- Estadio IV (29): El miembro posterior crece en longitud alcanzando una vez y media el valor de su diámetro.
- Estadio V (30): El miembro posterior se alarga y adquiere forma más o menos cónica, marcándose apenas una escotadura que señala la separación entre el autopodio y el resto del miembro.
- Estadio VIII (33): Hay una elongación del dedo 4, con lo que queda bien determinada su separación de los dedos 3 y 5. Se profundiza la hendidura entre los dedos 3-2.

MÉTODOS DE ESTUDIO

Observaciones Macroscópicas

Las observaciones macroscópicas se llevaron a cabo con un microscopio estereroscópico Photomakroskop M 400 (Wild, Switzerland) y las fotografías con película TMax 400 (Kodak Eastman).

Observaciones de microscopía óptica y análisis histológico

Los embriones y larvas fueron fijados por inmersión en el líquido de Bouin durante 3h. (90' a 4°C y 90' a temperatura ambiente); luego los ejemplares fueron lavados y conservados en etanol 70° a 4°C. Para efectuar el análisis histológico, fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes (10' en cada uno), en una mezcla de alcohol absoluto y xilol (10'), en xilol puro (10') e incluidos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C).

De las piezas seleccionadas se realizaron cortes seriados en sentido transversal, longitudinal o frontal con un espesor de 6µm, utilizando un micrótomos Leitz. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos recubiertos con albúmina para practicar coloraciones histológicas convencionales; los preparados fueron mantenidos una semana a 30° C para su total secado.

Las técnicas de tinción utilizadas fueron Hematoxilina alcohólica de Ehrlich-eosina acuosa y Tricrómico de Mallory, para lo cual los cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados en una serie descendente de alcoholes y lavados en agua destilada antes de efectuar la coloración; posteriormente fueron nuevamente deshidratados, clarificados en xilol y montados con medio sintético (Permout, Fisher Sci.).

Las observaciones y fotomicrografías se llevaron a cabo en un fotomicroscopio Polyvar (Reichert-Jung) con película TMax 100 (Kodak), Kodak Gold 100 o Fujicolor 100.

RESULTADOS

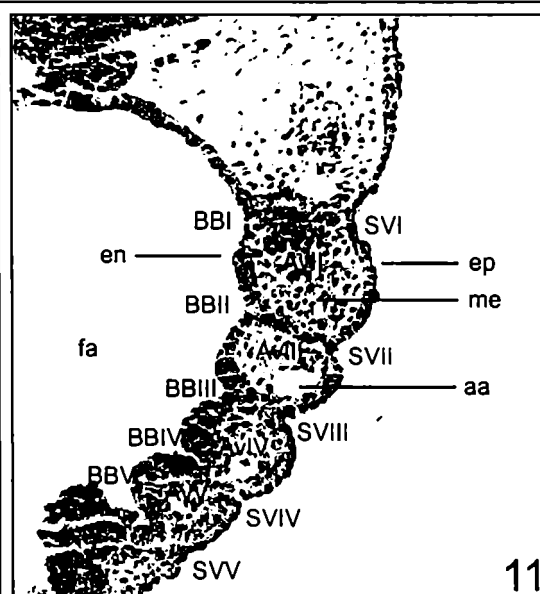
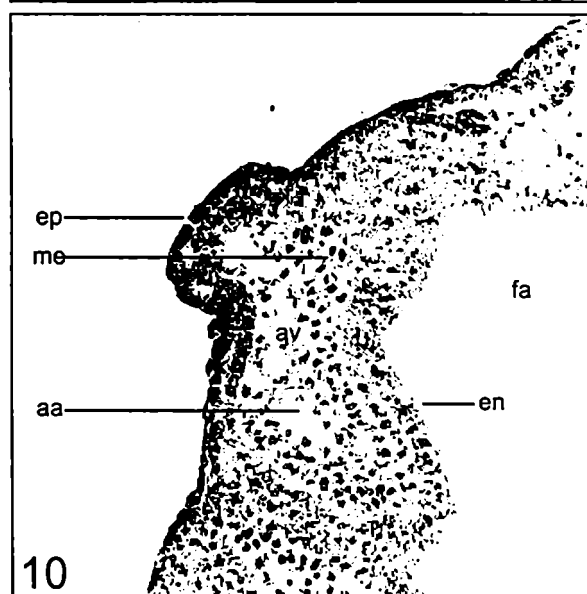
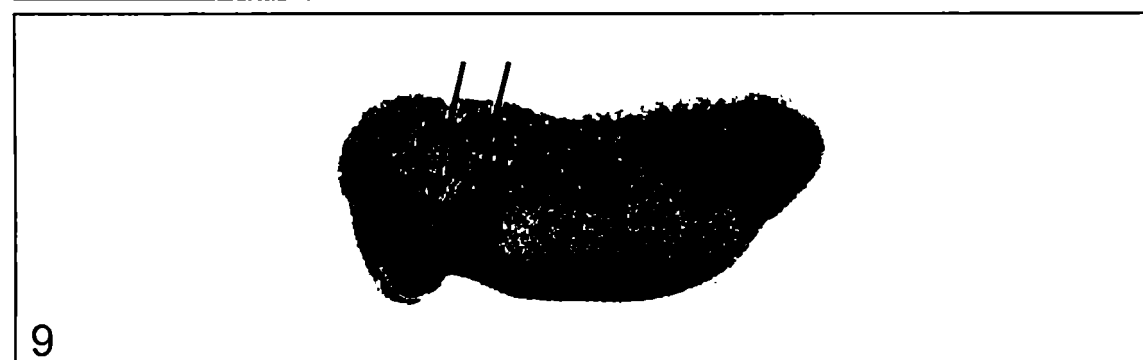
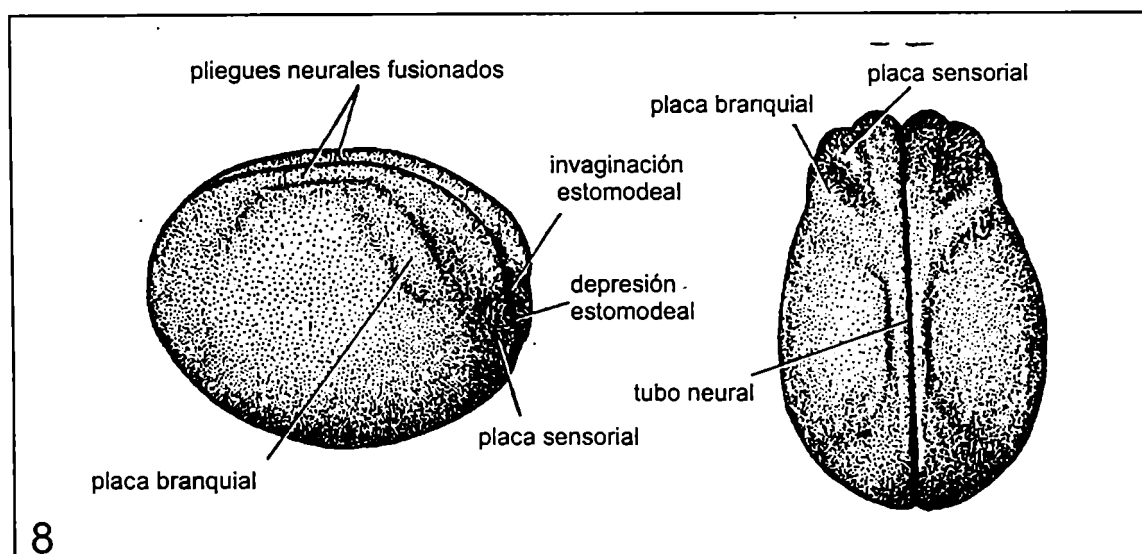
OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS ANÁLISIS HISTOLÓGICO

- **Estadios 15-16 (15-16)**

En el estadio de néurula se observaron externamente engrosamientos verticales a cada lado de la cabeza que, posteriormente dan lugar a los arcos viscerales. Estas zonas del embrión se conocen como las placas branquiales. (fig. 8).

- **Estadios 17-18 (17-18)**

En estos estadios se observó en el área branquial unas protuberancias a cada lado de la cabeza, debajo de los placodes ópticos, en los que se podían distinguir tres áreas engrosadas correspondientes a los arcos branquiales (fig. 9). La morfología interna del embrión mostró a los arcos viscerales como condensaciones de células de origen mesodérmico; entre ellas era posible observar algunos espacios correspondientes a los arcos aórticos (que se diferenciaron a partir de ese mesénquima), aunque no se encontraron en este estadio células endoteliales. Los arcos viscerales presentan una cubierta externa de epidermis ectodérmica y una capa interna de endodermo faríngeo (figs. 10 y 11). Las células de las tres hojas embrionarias contienen gránulos de pigmento y un gran número de plaquetas vitelinas, característicos de células no diferenciadas.



La epidermis está formada por dos láminas de células cuboides: la capa externa o peridermis, donde se encuentran células muy pigmentadas, ciliadas y algunas glándulas, y la interna o sensorial, no pigmentada, que descansa sobre la lámina basal; las células endodérmicas se distinguieron de las ectodérmicas por su coloración eosinófila .

Entre los arcos viscerales se observaron las bolsas faríngeas o branquiales I a VI, de origen endodérmico, formadas por un epitelio de células cilíndricas muy eosinófilas; en este estadio las bolsas ya se encontraban en contacto con los surcos viscerales epidérmicos (fig. 11).

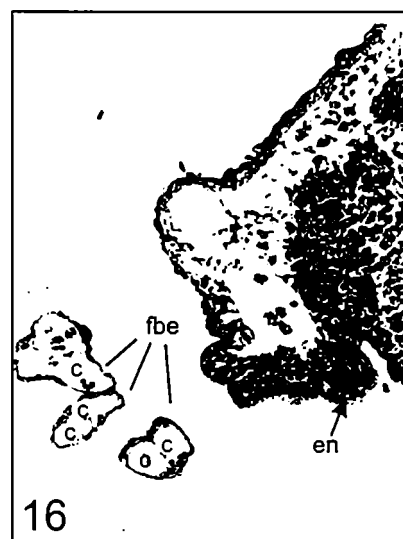
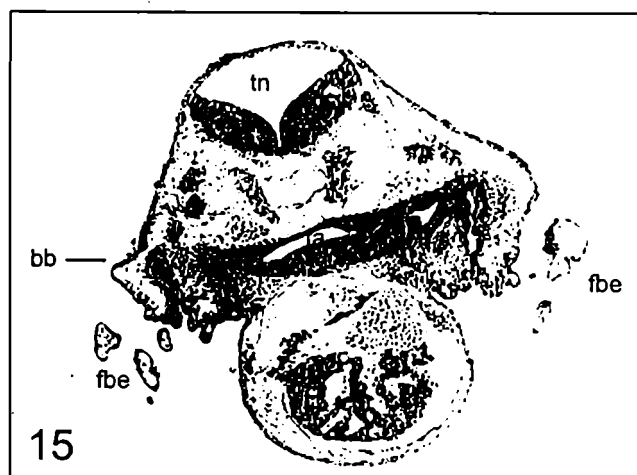
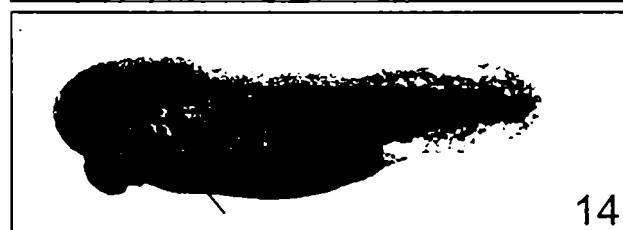
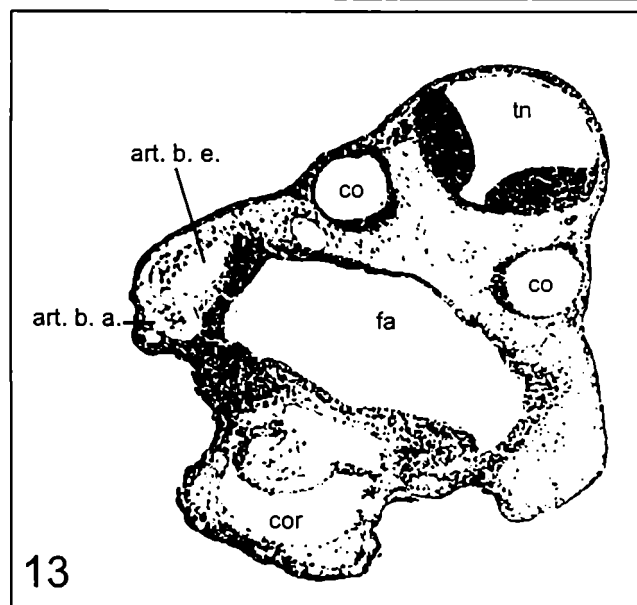
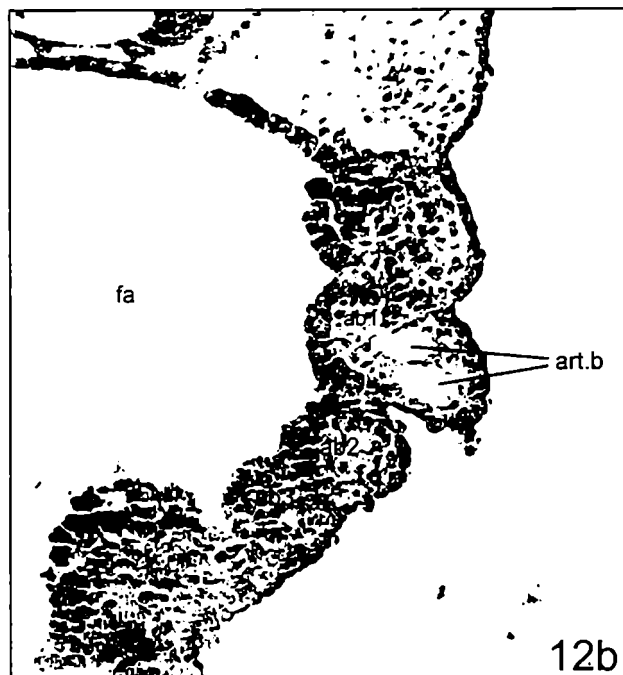
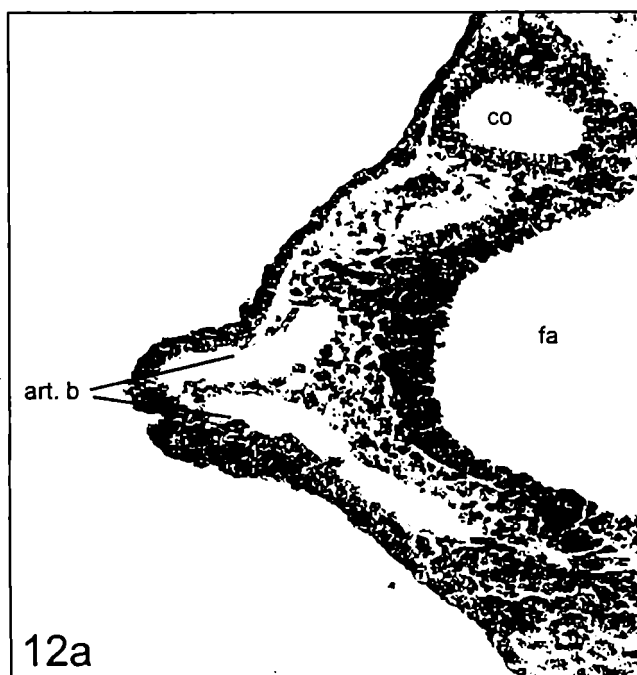
- **Estadio 19 (19)**

Los esbozos de las branquias externas han surgido sobre los arcos viscerales III, IV y V (denominados desde ahora branquiales 1, 2 y 3); tempranamente en el estadio, se han desarrollado el primer y segundo par de branquias, y posteriormente en el mismo estadio, surge el tercer par; estos esbozos se observaron como pequeñas protuberancias epidérmicas, que encierran algunas células mesenquimáticas y las arterias branquiales (fig. 12).

Los arcos aórticos que originan las arterias branquiales han surgido tempranamente en este estadio, desarrollándose en sentido antero-posterior, circundando el área branquial y conectando las raíces de la aorta dorsal par con la aorta ventral (fig. 2). En una etapa mas avanzada de este estadio, los arcos comienzan a ramificarse y se pueden distinguir funcionalmente las aortas aferentes de las eferentes (fig. 13).

- **Estadio 20 (20) - Estadio 21(21) - Estadio 22 (22)**

A lo largo de estos estadios se ha completado el desarrollo de las branquias externas, alcanzando su máximo tamaño en el estadio 22 (fig. 14); por transparencia era posible observar la circulación sanguínea en los filamentos branquiales a partir del estadio 20.



El análisis histológico mostró que las branquias se encuentran constituidas por una barra gruesa que se extiende hacia los lados (correspondiente al primer par de branquias), y una serie de filamentos ramificados a partir del segundo y tercer par de branquias (fig. 15).

Aunque la capa externa de la barra branquial y los filamentos están formados por una epidermis bilaminar como el resto del cuerpo, en las branquias, con el avance del desarrollo, las células han tomado un aspecto pavimentoso (fig. 16); la capa interna y ventral de las branquias se encuentra revestida del epitelio endodérmico, que presenta todavía un gran número de plaquetas vitelinas (fig. 16). Dentro de los filamentos se encuentran algunas células de tejido conectivo y numerosos capilares con eritrocitos.

Las hendiduras branquiales tercera y cuarta se han completado en el estadio 21 y 22 respectivamente, conectando el medio externo con la faringe (fig. 17).

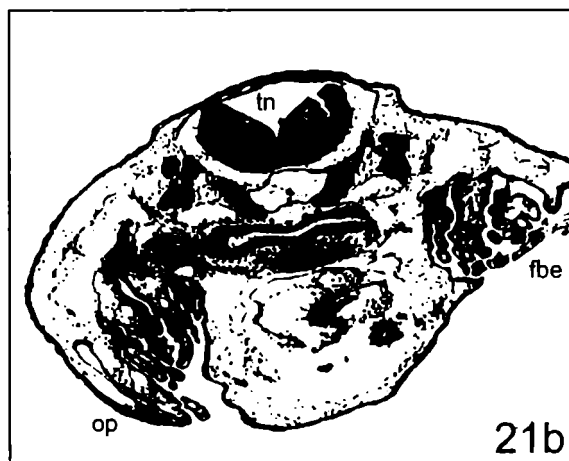
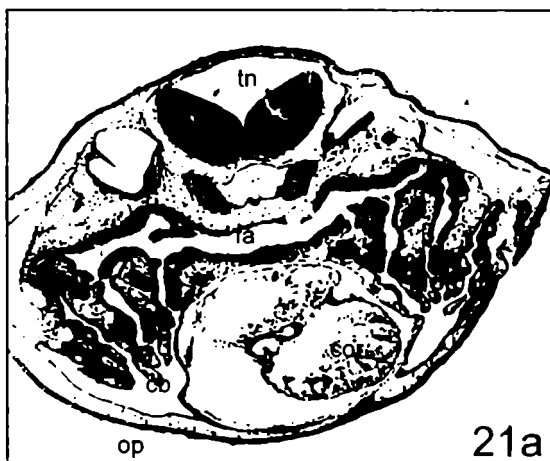
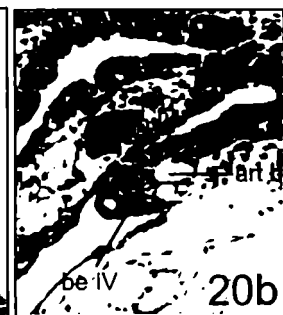
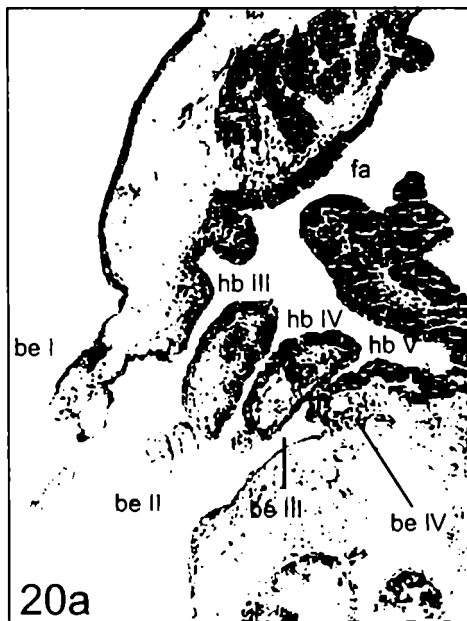
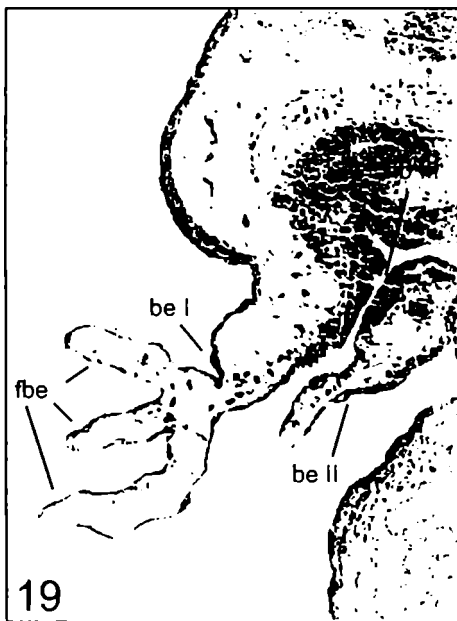
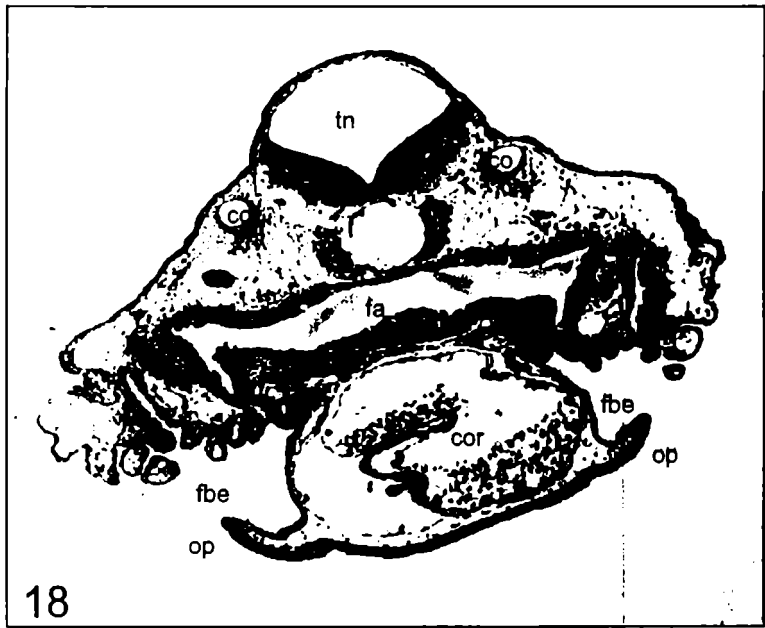
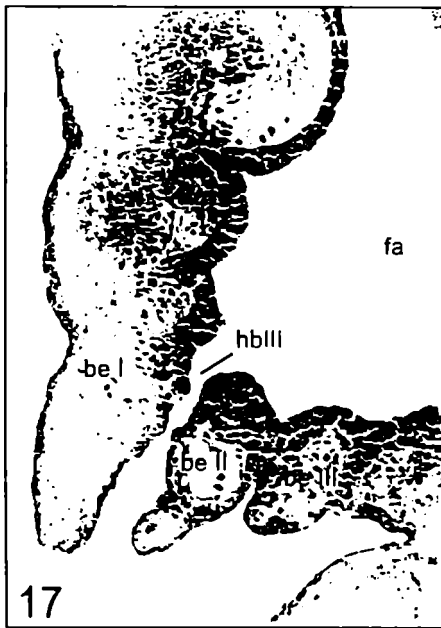
Los arcos aórticos tercero y cuarto son los responsables de la circulación en las branquias externas del primer y segundo arcos branquiales, dividiéndose luego en vasos primarios y secundarios, a partir de los cuales se desarrollan los “loops” capilares en los filamentos externos. Los vasos que corren de la aorta ventral hacia los filamentos son los vasos branquiales aferentes, mientras que los que salen de los filamentos hacia la aorta dorsal son los eferentes.

También se observó que el cuarto arco branquial (VI visceral) originó un pequeño lóbulo probablemente funcional, ya que mostraba circulación sanguínea.

- **Estadio 23 (23) - Pliegue opercular**

A partir del arco hioideo (II visceral) se ha desarrollado un pliegue epitelial, el opérculo, que aparece en este estadio como un collar a la altura del corazón (fig. 18).

El primer par de branquias se ha ramificado en la parte posterior en tres filamentos (fig. 19); se ha completado la quinta hendidura, de manera que se



encuentran tres pares de hendiduras branquiales funcionales y cuatro pares de branquias externas, aunque el último se presenta apenas desarrollado (fig. 20). Ha comenzado la condricificación de los arcos branquiales y las células embrionarias presentan una menor cantidad de gránulos de pigmento, evidenciando un avance en la diferenciación celular.

- **Estadio 24 (24) - Opérculo cerrado a la derecha**

El opérculo ha continuado creciendo en sentido antero-posterior, cubriendo las branquias externas y formando las cámaras branquiales; estas se encuentran cerradas parcial o completamente a la altura del corazón (fig. 21a), y en forma incompleta en la parte mas posterior de las branquias, a la altura del hígado (fig. 21b). Mientras que la epidermis externa del pliegue opercular es similar a la del resto del cuerpo, la capa interna sensorial presenta el tipo celular pavimentoso, análogo al de los filamentos branquiales externos (fig. 22). Ha continuado la condricificación de los arcos branquiales y se observa la diferenciación de células musculares en la base de los mismos, las que darán origen a los músculos constrictores branquiales.

A partir de la porción ventral y posterior de los arcos 1, 2 y 3 branquiales ha comenzado el desarrollo de las branquias internas; estas se presentan como una doble hilera de filamentos a ambos lados de los arcos 2 y 3, mientras que los branquiales 1 y 4 han dado origen a una hilera simple de filamentos sobre su porción posterior y anterior respectivamente.

El epitelio endodérmico ha continuado diferenciando y presenta un número menor de plaquetas que en los estadios anteriores (fig. 22); en los extremos posteriores de los filamentos externos se observan acumulaciones de pigmento y algunas células con signos característicos de muerte celular, correspondientes al inicio de actividad degenerativa en las células epidérmicas (ver Capítulo 2).

- **Estadio 25 (25) - Opérculo completo - Estadio I (26)**

El opérculo ha completado su desarrollo fusionándose con la pared del cuerpo, a excepción de un pequeño orificio en el lado izquierdo, el espiráculo (fig. 23a); de esta manera las branquias internas se ubican en dos cámaras a cada lado del corazón, cerradas ventralmente por el opérculo.

En cada cámara branquial, las paredes de la faringe dorsolateral y ventral han originado unas placas que separan la faringe del área branquial, constituyendo los velos dorsales y el velo ventral (fig. 24); estos pliegues están formados por un epitelio endodérmico que encierra tejido conectivo y algunos vasos sanguíneos. La parte superior del velo ventral, que linda con la faringe, está revestida por un epitelio simple que se continúa en un epitelio bi-estratificado en la parte lateral e inferior; este epitelio es similar al que presenta la faringe. El velo dorsal está formado por un epitelio simple en la parte superior del pliegue que da hacia la faringe, y se continúa lateralmente en un epitelio pseudoestratificado y ciliado (fig. 28). La parte lateral y ventral de las cámaras se encuentran aisladas de la cavidad celómica por un delgado mesotelio que se extiende desde la base del primer arco branquial hasta el cuarto, que las separa del pericardio y del opérculo (fig. 24).

Las larvas presentan cuatro pares de branquias internas sostenidas por el esqueleto cartilaginoso de los arcos branquiales, conocidos ahora como los ceratobranquiales 1-4 (fig. 24); entre los arcos, se observan las hendiduras branquiales II, III y IV que permiten el paso del agua desde la cavidad bucal y la faringe hasta los filamentos respiratorios.

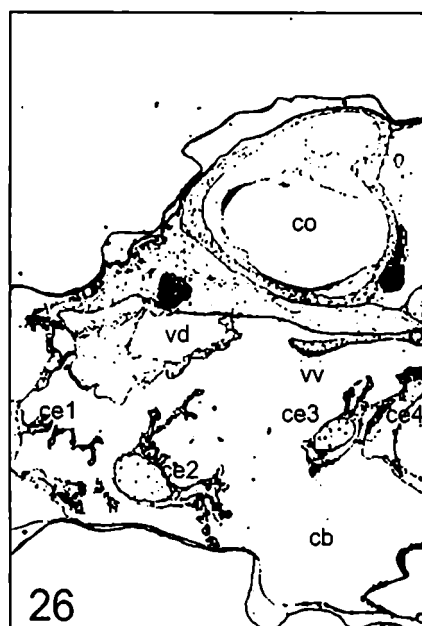
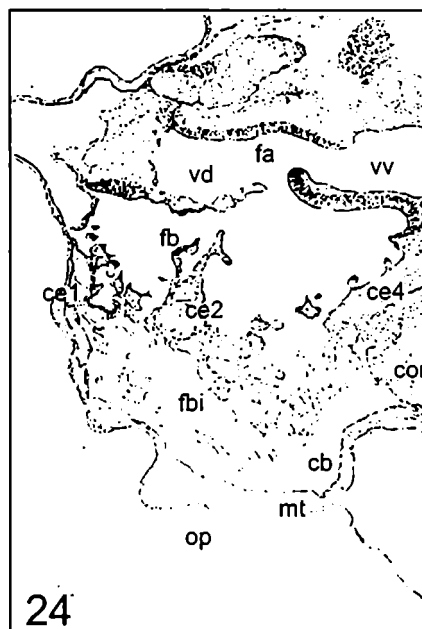
En la base ventral de cada ceratobranquial y rodeadas por tejido conectivo, se encuentran las arterias aferentes y eferentes (fig. 25); en los ceratobranquiales I a III también se insertan los músculos branquiales constrictores, que se extienden longitudinalmente en sentido antero-posterior (fig. 23). La circulación en el aparato filtrante es provista por ramificaciones de los arcos aórticos quinto y sexto, mientras que los músculos branquiales son irrigados por vasos provenientes del tercer arco aórtico.

En la parte dorsal de los arcos se insertan los filtros branquiales, mientras que ventralmente se observan las crestas o filamentos branquiales que cumplen la función respiratoria (figs. 24 y 25). Los filtros se insertan a ambos lados de los ceratobranquiales 2 y 3, pero solo de un lado del 1 y 4; en este estadio los filtros son placas o láminas simples compuestos por tejido conectivo y algunos vasos sanguíneos, y revestidos por un epitelio bilaminar, levemente cúbico, que se continúa alrededor del ceratobranquial y en parte de las crestas. Estas crestas están constituidas por un eje principal que luego se ramifica, cubierto de un epitelio simple o bicelular según el área, internamente muy vascularizados y con escasas células conectivas. Todavía se encuentran gránulos de pigmento entre las células epiteliales y algunas plaquetas vitelinas.

En la parte posterior de las cámaras branquiales se encuentran restos de las branquias externas; los filamentos se han acortado y presentan numerosas células degenerativas, con características morfológicas de muerte celular y cúmulos de pigmento oscuro. En etapas avanzadas del estadio, se observan cúmulos de restos celulares y pigmento, que rodean a algunos capilares sanguíneos (Ver Capítulo 2).

- **Estadio II (27) - Estadio IV (29) - Estadio V (30) - Estadio VIII (33)**

Los principales cambios producidos a lo largo de estos estadios se observaron en los filtros y las crestas branquiales, que se han ramificado notablemente (figs. 26, 27 y 29); el epitelio que reviste el eje de los filamentos respiratorios se mantiene levemente cúbico, mientras que se ha aplanado en las ramificaciones, tomando un aspecto pavimentoso. Estas ramificaciones se afinan hasta contener solo dos capilares, uno aferente y otro eferente. No se observan plaquetas vitelinas ni gránulos de pigmento entre las células epiteliales, evidenciando la diferenciación avanzada de las mismas.



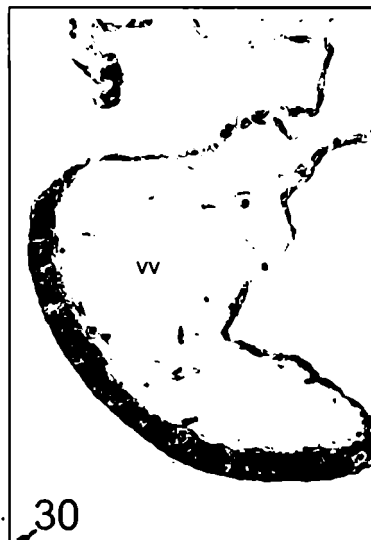
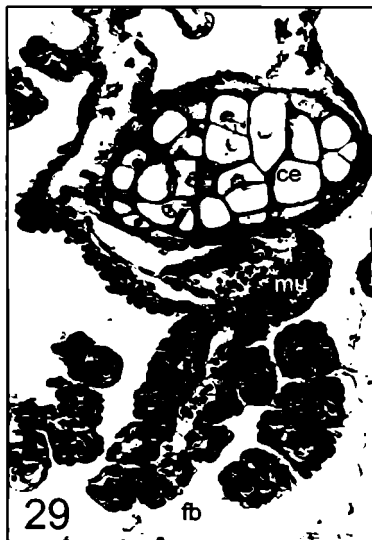
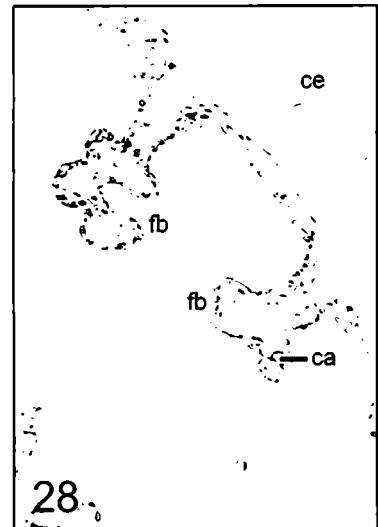
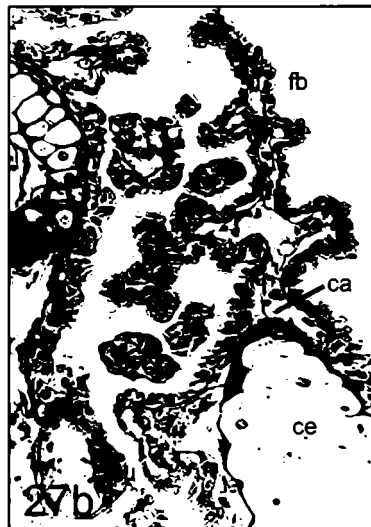
En el estadio II todavía se encuentran algunos restos de células de las branquias externas, como cúmulos de pigmento oscuro (Ver Capítulo 2); en el estadio IV ya no se detectan restos de estas células.

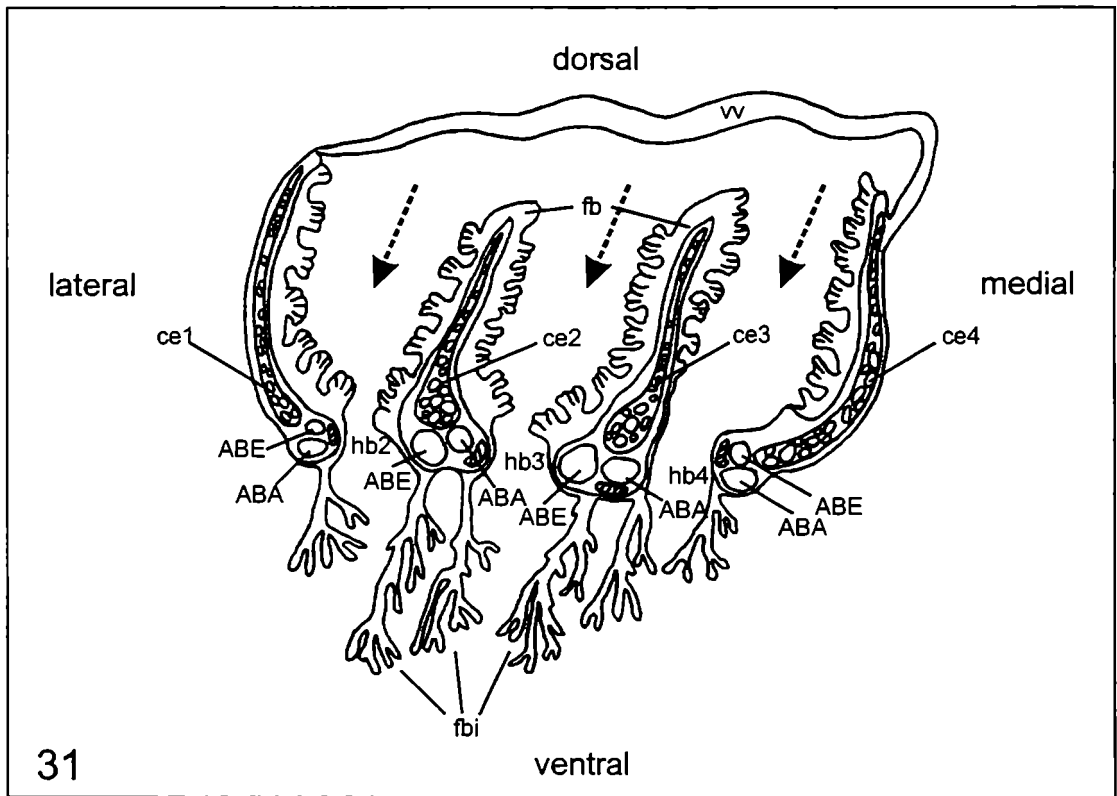
A partir del estadio II, se observa que el cartílago de los ceratobranquiales penetra en el eje de algunos de los filtros dorsales, ramificándose como pequeñas espinas cartilaginosas en los siguientes estadios (fig. 28). El tejido conectivo es denso en el interior de los filtros, y presenta algunos vasos sanguíneos (fig. 27b).

En el estadio IV se observa como las placas o láminas de filtros insertadas sobre los arcos branquiales se ramifican en dos o tres filas; el primer ceratobranquial presenta solo una lámina posterior de filtros branquiales, el cuarto arco presenta solo una placa anterior, mientras que el segundo y tercer arco presentan filtros en ambos lados.

En la base ventral de los ceratobranquiales, el tejido conectivo es escaso, al igual que entre las células de los filamentos respiratorios; entre las arterias aferentes y eferentes se observan algunos melanóforos (fig. 29). Los filamentos de las crestas se insertan de manera diferente en cada ceratobranquial: en la parte posterior del primer arco por debajo de la arteria branquial aferente, en la parte posterior del segundo arco bajo las arterias branquiales aferente y eferente, en la parte anterior del tercer arco y bajo ambas arterias también, y en la parte anterior del cuarto arco bajo la arteria aferente.

En los estadios IV, V y VIII las células ciliadas de los velos dorsales y ventrales se presentan extremadamente eosinófilas o muy afines por la fucsina, de acuerdo con la coloración utilizada, indicando la presencia de algún tipo de secreción (fig. 30).





DISCUSIÓN

Si bien el grado de desarrollo de las branquias puede variar entre las distintas especies de anfibios (Mc Indoe y Smith, 1984), las observaciones realizadas en *Bufo arenarum* en el presente trabajo son similares en rasgos generales a descripciones previas de branquias de anuros; sin embargo, algunos aspectos y consideraciones distintos han de ser destacados.

En los anuros las branquias externas surgen a partir de los arcos viscerales III, IV y V, y se encuentran constituidas por tres pares de estructuras filamentosas; en este aspecto coinciden los embriones de *Rana sylvatica* (Huettnner, 1948), *Xenopus laevis* (Niewkoop y Faber, 1956), *Rana pipiens* (Michaels *et al*, 1971) y *Discoglossus pictus* (Hourdry, 1974). En *Bufo arenarum*, estos órganos surgen a partir de los arcos viscerales III, IV, V y VI, formándose cuatro pares de branquias, separadas por tres hendiduras funcionales; si bien el cuarto par es muy pequeño y no se encuentra ramificado, probablemente es funcional ya que presenta circulación sanguínea. Aunque anteriormente se había descrito la presencia de un sexto par de hendiduras branquiales en ranas, estas eran abortivas y por lo tanto no funcionales (Huettnner, 1948). No hay estudios al respecto en otras especies del género *Bufo*, los que serían de gran utilidad para establecer si esta condición de de “cuarto par branquial funcional” representa una sinapomorfía de la familia Bufonidae.

Las branquias externas comienzan a ser funcionales al iniciarse el movimiento de los embriones, aún antes de perforarse las hendiduras branquiales y de la apertura de la boca en el caso del género *Rana* (Huettnner, 1948); este aspecto es corroborado en *Bufo arenarum*, ya que apenas pasado el estadio 19 en que los filamentos han comenzado a protruir, se observa la presencia de circulación sanguínea en los mismos, aun cuando los embriones todavía no nadan activamente.

Al igual que en otros anuros, las branquias internas de *Bufo arenarum* se localizan en dos cavidades o cámaras a cada lado del corazón; están constituidas por cuatro pares de branquias y tres hendiduras funcionales. En la parte superior de cada cámara branquial se observan los velos dorsales y ventrales, originados a partir de pliegues de la pared de la faringe y que, al igual que esta, son de origen endodérmico; el velo ventral es la elongación posterior del piso de la cavidad bucal (fig. 1c) mientras que el dorsal se origina en el techo de la misma cavidad. Estos velos separan a la faringe de los filamentos branquiales y forman parte del aparato bucofaríngeo, responsable de la alimentación en las larvas herbívoras de anuros (Gradwell, 1972). Parte del velo ventral se diferencia en otras estructuras glandulares ("branchial food traps" y la zona de transición), constituyendo con las almohadillas y surcos ciliares (originados a partir del esófago) el aparato filtrante (Viertel y Richter, 2000); una de sus funciones sería impedir el paso de partículas alimenticias hacia el área de intercambio gaseoso. Algunos autores consideran que los filtros branquiales constituyen también parte de la bucofaringe; sin embargo, la mayor parte de la bibliografía contemporánea sigue considerando a los filtros como parte del sistema branquial, incluso con participación en la función respiratoria. Esta teoría fue propuesta por Mc Indoe y Smith (1984) debido a la concentrada red de vasos sanguíneos presente en los filtros de *Litoria ewingii* y su ubicación en la corriente irrigatoria, aún tomando en cuenta algunos aspectos negativos: el epitelio de los filtros es mas grueso que el de las crestas, esta cubierto de mucus y la corriente sanguínea eferente es drenada a través de vasos venosos y no presenta conexión con el corazón a través de las arterias branquiales. Estos autores han sugerido que la baja presión de oxígeno observada en las arterias aferentes significaría que los filtros extraen el oxígeno necesario para su metabolismo de la corriente circundante, y que por lo tanto las crestas branquiales serían los órganos mas importantes en el intercambio gaseoso para la provisión de oxígeno al total del organismo.

Una vez que el agua penetró en la cavidad bucal, pasa entre los velos y penetra en la parte filtrante de las branquias alcanzando luego a los filamentos respiratorios de las branquias a través de las hendiduras interbranquiales, para finalmente salir de las cámaras branquiales por el espiráculo. Como éste es asimétrico, el agua de la cámara derecha debe pasar a través de un estrecho canal, ventral al pericardio, hacia el lado izquierdo; la cámara izquierda está conectada directamente con el espiráculo. En *Bufo arenarum*, el espiráculo es una pequeña abertura tegumentaria que no presenta ningún tipo de válvula muscular o membranosa, en coincidencia con lo observado anteriormente en *Rana catesbeiana* (Gradwell, 1972a).

Cada branquia interna diferenciada de *Bufo arenarum* consiste de un ceratobranquial en el que se insertan dorsalmente los filtros y ventralmente los filamentos respiratorios; el patrón de inserción y ramificación de los filamentos respiratorios a partir de los arcos branquiales en esta especie es algo irregular como para ser considerado una fila simple según lo observado en *Pelobates fuscus* (Schulze, 1892) o en *Rana catesbeiana* (Gradwell 1972). Tampoco una doble fila como en *Rana sylvatica* (Huettnner, 1948) o en *Rana temporaria*, en que los filamentos se insertan en las caras anteriores y posteriores de los tres primeros ceratobranquiales, y solo en la anterior del cuarto arco (Rugh, 1951); como en *Litoria ewingii* (Mc Indoe y Smith, 1984), las larvas de *Bufo arenarum* muestran diferencias entre los cuatro arcos branquiales. En esta especie, los filamentos se insertan en la parte posterior del primer arco bajo la arteria branquial aferente, en la posterior del segundo arco bajo las arterias branquiales aferente y eferente, en la anterior del tercero bajo ambas arterias, y en la anterior del cuarto bajo la arteria aferente (fig. 31).

Los filamentos respiratorios están formados por un epitelio de origen endodérmico, uni o bilaminar según el área, tejido conectivo de origen mesodérmico con algunas células endodérmicas esparcidas en él, y capilares de origen mesodérmico; la presencia de las células endodérmicas indicaría que los filamentos

se originan en la zona de transición ecto-endodérmica, como ha sido sugerido para otras especies (Viertel y Richter, 2000). El tejido conectivo está poco desarrollado en la base de los filamentos y es escaso en las áreas distales, por lo que los capilares contactan directamente el epitelio.

El primer arco branquial presenta solo una placa o lámina posterior de filtros branquiales, el segundo y tercer arco presentan filtros en ambos lados, y el cuarto arco presenta solo una placa anterior; estas placas se ramifican a su vez en numerosas filas de filtros que amplían la superficie de filtrado. Este patrón coincide con las observaciones efectuadas en larvas de *Xenopus laevis*, *Bombina variegata*, *Bufo calamita* y *Rana temporaria* (Viertel y Richter, 2000). En cuanto a la estructura histológica, los filtros dorsales también presentan un epitelio bilaminar similar al de las crestas, con un tejido conectivo denso internamente y algunos vasos sanguíneos, de manera similar a otras larvas de anuros.

Los músculos asociados a los ceratobranquiales de Anuros son de una gran complejidad; en el presente trabajo solo se han observado los músculos constrictores en la base de los ceratobranquiales I a III, asociados a las arterias aferentes. Estos músculos son los que aparentemente regulan el flujo de agua a través de las hendiduras branquiales por medio de cambios en la posición del septo interbranquial (Cannatella, 2000).

En resumen, las observaciones realizadas en el desarrollo y anatomía del aparato branquial de *Bufo arenarum*, muestran una coincidencia en líneas generales con los resultados descritos en otras especies de anuros. Por otra parte se demuestra la complejidad del sistema branquial basado en un heterogéneo origen de sus partes constitutivas, ya que contribuyen en su formación tanto células endodérmicas, mesodérmicas y ectodérmicas, como así también algunas originadas en las crestas neurales.

Capítulo 2

PROLIFERACION CELULAR Y APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS

INTRODUCCIÓN

PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO

Adicionalmente al proceso de morfogénesis, los cambios en la forma del embrión durante el desarrollo son producidos por otras vías, tales como la proliferación y muerte celular selectivas, eventos involucrados en la generación del tipo y número celular durante la embriogénesis animal (Ellis *et al*, 1991).

Mucho antes de la gran remodelación estructural y funcional que implica la metamorfosis en los anuros, en etapas tempranas de su desarrollo, las branquias son los órganos que muestran algunos de los cambios morfológicos mas conspicuos. Estos cambios incluyen una notoria proliferación celular durante el desarrollo de los tejidos branquiales externos e internos, esta última, contemporánea con la muerte celular que se observa en el proceso de involución de las branquias externas, y una activa diferenciación celular que posibilita la rápida participación de las branquias en los procesos respiratorios y osmorreguladores.

La proliferación celular es un proceso fundamental durante el crecimiento y desarrollo de los órganos, constituyendo el ciclo celular el concepto central del mismo (Howard y Pelc, 1951). En una célula eucariótica típica este ciclo se puede dividir en cuatro fases conocidas como G1 ("gap 1", intervalo post-mitótico), S (síntesis de ADN), G2 ("gap 2", intervalo post-sintético) y M (mitosis) (fig. 1), de las que resultan dos células hijas que pueden repetir el mismo ciclo, especialmente en un tejido en activa división. Las células que no se encuentren en una etapa proliferativa, pueden pasar por una fase G0 (post-mitótica), pero a partir de un estímulo adecuado, pueden reingresar al ciclo celular activo (Boulton y Hodgson, 1995).

Durante muchos años, los estudios de división celular se centraron en la mitosis debido a la posibilidad de su seguimiento a nivel microscópico; con el avance de

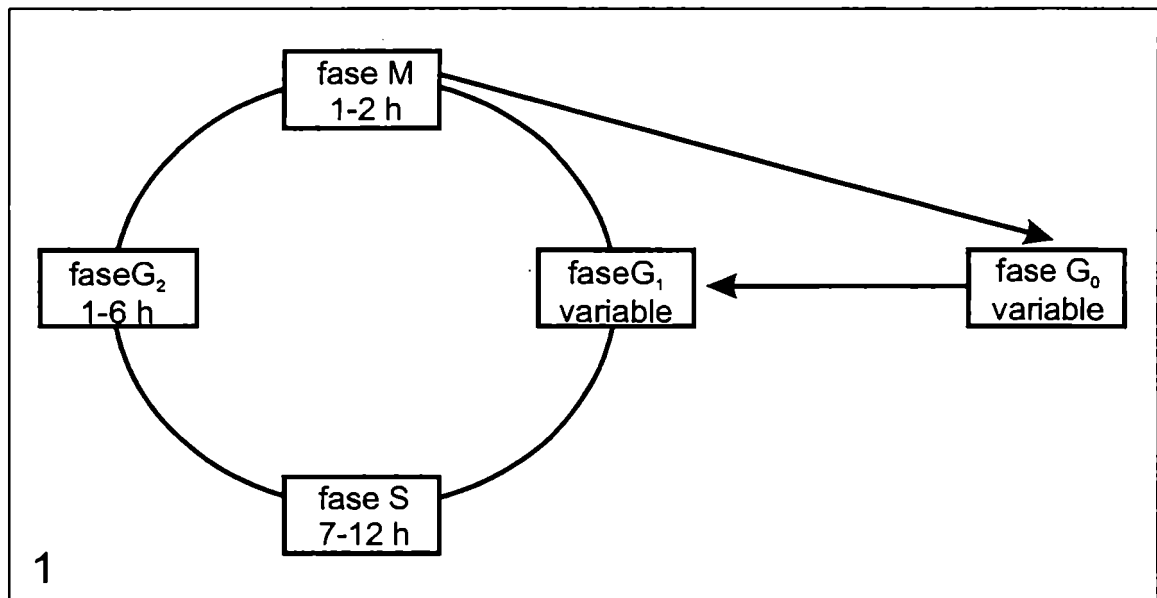


Figura 1: Ciclo celular . Tomado de Boulton y Hodgson (1995).

la tecnología en biología celular y molecular, se encontraron que existen ciertas proteínas presentes en las células proliferativas que se expresan sincrónicamente con diferentes estadios del ciclo celular. Si bien no se conoce su función en todos los casos, se ha determinado la participación de algunas de ellas en la síntesis de ADN. Mediante la utilización de anticuerpos contra estas proteínas como marcadores moleculares, se pueden reconocer las etapas de síntesis de una célula; algunas de estas proteínas endógenas asociadas a la proliferación son p105 (Clevenger *et al*, 1987), α -ADN polimerasa (Seki *et al*, 1990), Ki 67 (Gerdes *et al*, 1983) y PCNA (Miyachi *et al*, 1978).

PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), es una proteína nuclear ácida de 36 kDa, reconocida como una ciclina en 1984 (Mathews *et al*, 1984), que actúa como auxiliar de la δ -ADN polimerasa (Prelich *et al*, 1987; Bravo *et al*, 1987). Es una molécula estable cuya secuencia aminoácídica ha sido altamente conservada durante la evolución (Moriuchi, 1990) y que se encuentra presente en un amplio rango de especies incluyendo mamíferos (Foley *et al*, 1991), peces (Negishi *et al*, 1991; Ortego *et al*, 1994; Nomura, 1994), anfibios (Leibovici *et al*, 1992) invertebrados (Yamaguchi *et al*, 1991), e incluso plantas (Daidoji *et al*, 1992).

Aunque se ha determinado que PCNA se encuentra en todo tipo de tejidos y es esencial para la replicación del ADN en diversos tipos celulares (Tan *et al*, 1986; Bravo y McDonald-Bravo, 1987; Prelich *et al*, 1987) todavía no se ha establecido su rol con exactitud. La expresión de PCNA es variable a lo largo del ciclo celular, aumentando durante la fase G1 hasta alcanzar un pico máximo en S, y declinando posteriormente en G2 y M (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987); no ha sido detectada su expresión en la fase G0 (Kurki *et al*, 1986). En la fase S temprana los anticuerpos contra PCNA han mostrado una localización difusa, mientras que en el período de máxima síntesis de ADN el patrón hallado es de tipo punteado (Bravo y Macdonald-Bravo, 1985; Celis y Celis, 1985).

En embriones tempranos de *Xenopus*, PCNA ha sido detectada por inmunocitoquímica sólo en el núcleo y durante la fase S (Leibovici *et al*, 1992), aunque es posible su extracción en otras etapas del ciclo; estas observaciones y otras realizadas en células en cultivo, sugieren la existencia de dos formas moleculares distintas y quizás con diferentes funciones (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987; Leibovici *et al*, 1992). En cualquier caso, los estudios realizados establecen que la detección y distribución de PCNA durante la embriogénesis de los anfibios, permite identificar cronológicamente y analizar la participación de los distintos grupos celulares en la formación de los órganos larvales.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE LA REGRESIÓN DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS

Si bien el concepto de que la muerte celular forma parte de un proceso normal durante la renovación de los distintos tejidos, la regulación de las poblaciones celulares y la morfogénesis de los embriones, ya fue enunciado mas de cincuenta años atrás (Glücksman, 1950), sólo en los últimos años se ha comenzado a estudiar en forma intensiva (Ellis *et al*, 1991; French-Constant, 1992; Rubin *et al*, 1993; Tata, 1994; Sgonc y Wick, 1994; Bredesen, 1995; Kroemer *et al*, 1997; Hetts, 1998; Huppertz *et al*, 1999). Este proceso es denominado 'Muerte Celular Programada' (MCP) debido al concepto aceptado de que las células "disparan" un programa intrínseco de muerte y contribuyen activamente de esta manera a su propia desaparición; alternativamente, se utiliza el término "apoptosis" (Kerr *et al*, 1972), el que originalmente definía el aspecto morfológico de un tipo particular de muerte celular "fisiológica", en contraposición al observado en las muertes celulares "necróticas".

Algunos autores sugieren aplicar la denominación de apoptosis solo a la muerte celular que se observa en el recambio de los tejidos normales adultos, y la de MCP para describir la involución celular durante la embriogénesis (Ruibal-Ares *et al*,

1994); sin embargo, en la actualidad, la mayoría de los investigadores utilizan indistintamente ambos términos para describir las muertes celulares que implican una autonomía en la señal de iniciación, a través de un programa interno de la célula.

La MCP o apoptosis consiste de una serie de etapas durante las cuales la célula sufre cambios morfológicos y moleculares típicos, que se presenta durante el desarrollo embrionario tanto de invertebrados como de vertebrados (Ellis *et al*, 1991; Ffrench-Constant, 1992; Oppenheim, 1991; Bredesen, 1995), y que se encuentra involucrada en el mantenimiento del balance de las poblaciones celulares de los tejidos y órganos durante la embriogénesis y la vida adulta de los organismos (Darfler y Karaszkiewicz, 1995).

La apoptosis requiere la coordinación de procesos biológicos energético-dependientes y dirigidos genéticamente (Huppertz *et al*, 1999); esto es comparable a los procesos de proliferación y diferenciación, los que son normalmente iniciados por interacciones específicas de receptor-ligando. Por otra parte, la MCP implica la acción de activadores, efectores y reguladores negativos; este proceso puede ser visto como una secuencia de eventos en cascada, la cual no está totalmente clarificada (Villa *et al*, 1997). La complejidad de la cascada apoptótica es otro aspecto que muestra la relación estrecha entre este tipo de muerte celular y el proceso de diferenciación, ya que ambos involucran algunas secuencias idénticas (Hengartner, 1997; Huppertz *et al*, 1999).

Este tipo de muerte es diferente de las muertes celulares patológicas como la necrosis, las cuales no forman parte del programa embriológico animal y que son causadas por daños físicos, químicos y osmóticos, con la consecuente pérdida de la integridad de las membranas celulares. En cambio, la MCP o apoptosis involucra la participación activa de enzimas endógenas en la mediación de la muerte celular, previamente a la desaparición de las membranas (Kroemer *et al*, 1995). Además existen diversos aspectos bioquímicos y morfológicos que diferencian a la necrosis de la MCP (Wyllie, 1981; Bredesen, 1995); uno de los aspectos principales en muchos

tipos celulares, aunque no en todos, consiste en el clivaje del ADN en nucleosomas, debido a la activación de endonucleasas endógenas. Los trabajos efectuados han demostrado dos fases en la digestión del ADN (Earnshaw, 1995): la primera que involucra el clivaje del genoma en fragmentos de 200-300 y 30-50 kb; la segunda fase implica otro clivaje enzimático que produce oligonucleosomas.

En el núcleo y citoplasma de las células apoptóticas se observan cambios morfológicos que se corresponden con esta fragmentación del ADN; estos cambios están caracterizados por una condensación de la cromatina en la periferia nuclear, un colapso del núcleo, contracción o reducción del volumen celular, la pérdida de los contactos y uniones intercelulares y de las microvellosidades. En etapas tardías, las mitocondrias se encuentran desorganizadas y se observan los cuerpos apoptóticos, constituidos por fragmentos de núcleo y citoplasma incluidos en una porción de membrana plasmática; estos son luego fagocitados por células vecinas, sin producir una respuesta inflamatoria en el tejido (Wyllie, 1981; Kerr *et al*, 1995)

La MCP se encuentra involucrada en la morfogénesis de diversos órganos en vertebrados, como el riñón (Koseki *et al*, 1992), el timo (Ruben *et al*, 1994) y el páncreas (Grassi Milano y Chimenti, 1995), en la formación de dígitos (Mori *et al*, 1995), en el desarrollo del sistema nervioso (Clarke 1990; Oppenheim, 1991; Bredesen, 1995), etc.; también se ha establecido que este proceso juega un rol primordial durante la metamorfosis de anfibios, en la regresión de algunos tejidos como la cola, y en la reorganización estructural de otros, como el intestino (Tata, 1994; Nishikawa y Hayashi, 1995; Ishizuya-Oka y Ueda, 1996).

Estudios realizados en peces, han demostrado la presencia de células apoptóticas en el epitelio branquial de embriones de *Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*, variando la distribución de los núcleos apoptóticos según el estadio y siendo mas frecuentes durante el alevinaje (Rojo *et al*, 1997; Rojo y Gonzalez, 1998, 1999). Utilizando técnicas de microscopía electrónica y bioquímicas, los autores

distinguieron varias fases apoptóticas en distintos tipos de células branquiales: pavimentosas, células de cloruro y de la glándula de "hatching".

Si bien existen numerosos trabajos sobre la degeneración de las branquias durante la metamorfosis, especialmente en relación a la regulación hormonal de este proceso por T_3 y T_4 (Fox, 1983), la regresión de las branquias externas durante la embriogénesis de los anuros ha sido estudiada en pocas oportunidades; sin embargo, los filamentos branquiales externos constituyen un excelente sistema para estudiar la muerte celular embrionaria en anfibios, ya que su desaparición se presenta en un período bastante anterior y diferente al de la metamorfosis.

El único trabajo conocido que ha encarado esta temática en Anuros es el de Michaels *et al* (1971), quienes describieron la ultraestructura de los filamentos externos y algunos aspectos ultraestructurales de la degeneración de los mismos en *Rana pipiens*. Estos autores encontraron alteraciones morfológicas en los núcleos celulares: la cromatina se presentaba como "clumps" electrodensos y se observaron modificaciones en la conformación de la membrana nuclear; además, en el citoplasma de las células degenerativas se encontraron numerosos lisosomas y, posteriormente, la formación de grandes vacuolas autofágicas que contenían fosfatasa ácida lisosomal.

En cuanto a las técnicas aplicadas en los estudios de muerte celular, los resultados obtenidos en las branquias embrionarias de *Salmo trutta* mostraron dificultades en la detección de células y cuerpos apoptóticos cuando solo se aplican técnicas morfológicas y ultraestructurales (Rojo y Gonzalez, 1998), por lo cual sería recomendable corroborar este tipo de estudio con técnicas bioquímicas de marcación del ADN durante su fragmentación.

OBJETIVOS

Debido a la falta de trabajos que demuestren los procesos que llevan a la desaparición de las branquias externas en Anuros, hemos encarado un estudio en *Bufo arenarum* para dilucidar si tales eventos se verifican por muerte celular programada. Paralelamente se ha estudiado la proliferación celular presente en los mismos estadios, ya que ambos procesos se encuentran íntimamente ligados.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo ha sido examinar los procesos de proliferación y muerte celular durante el desarrollo secuencial de las branquias externas e internas, y la desaparición de las primeras en etapas embrionarias.

Con el objeto de reconocer las fases proliferativas, se aplicaron técnicas inmunocitoquímicas para la detección de una proteína asociada al proceso de división celular en los estadios embrionarios y larvales anteriormente estudiados con técnicas histológicas clásicas. Para clarificar los mecanismos involucrados en la desaparición de las branquias externas, se estudió el proceso de muerte celular en los embriones de *Bufo arenarum* a través del análisis histológico en los estadios embrionarios de transición entre ambos órganos y se aplicó la técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) para la detección *in situ* de fragmentos de ADN en los mismos estadios.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Ver Capítulo 1.

MÉTODOS DE ESTUDIO

Microscopía Óptica y análisis histológico

Embriones y larvas correspondientes a los estadios 23, 24, 25-I y II fueron procesados y observados según lo especificado en el Capítulo 1.

Técnicas Inmunocitoquímicas

Embriones y larvas entre los estadios 20 y IV fueron fijados por inmersión en líquido de Bouin durante 3h (90' a 4°C y 90' a temperatura ambiente), luego los ejemplares fueron lavados y conservados en alcohol 70° a 4°C.

Posteriormente los ejemplares fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes, mezcla de alcohol-xilol, dos baños de xilol, e incluidos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C).

De las piezas seleccionadas se realizaron cortes seriados en sentido transversal, con un espesor de 6µm, utilizando un micrótomos Leitz. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos y mantenidos una semana a 30°C para su total secado. Las secciones fueron desparafinadas en xilol, hidratados en una serie descendente de alcoholes y en buffer fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7.4, durante 30'; para inhibir la actividad de peroxidasas endógenas, los cortes fueron tratados con una solución de 3% de H₂O₂ en PBS durante 10', y enjuagados en PBS varias veces. Para bloquear una eventual actividad inespecífica de otras proteínas, los cortes fueron inmersos en una solución 5% de leche descremada, 0,02% de Tritón X-100 en PBS durante 40', y enjuagados en PBS.

El anticuerpo primario (anti-PCNA, clon PC10, Enzo Diagnostics Inc.) fue diluido en concentraciones adecuadas de PBS y aplicado sobre las secciones histológicas, las que fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C durante 20h.

El control negativos efectuado para probar la especificidad del anticuerpo primario fue la omisión del anticuerpo primario y aplicación de PBS en su lugar.

Como control positivo se tuvo en cuenta la inmunomarcación presente en la capa germinativa (ventricular) del tubo neural, en donde se verifica una intensa proliferación de las “stem cells” neuronales.

Después de enjuagar los cortes en PBS, fueron tratados nuevamente con la solución de leche descremada y Triton durante 60' y luego lavados en PBS.

Para la inmunodetección, se aplicó el método avidina-biotina, utilizando Extravidina (Sigma) o el kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA); las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con el anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido en PBS, durante 30-60' a temperatura ambiente, lavados en PBS, e incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, 30-60' a temperatura ambiente. Luego los portaobjetos fueron lavados en PBS y revelados con una solución de 3.3'-diaminobenzidina (DAB) o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Vector) y H₂O₂ para detectar la peroxidasa; la inmunoloración observada utilizando DAB es marrón, mientras que en el caso del AEC, la coloración es roja.

El seguimiento del proceso de revelado se llevó a cabo en el microscopio. La reacción fue detenida en agua destilada, las secciones fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcoholes, clarificadas en xilol y montados con el medio sintético DPX (Fluka, Suiza). Los preparados fueron observados y fotografiados de acuerdo a lo mencionado en el Capítulo 1.

Método TUNEL

Para el estudio de células apoptóticas en embriones y larvas se aplicó el método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling), que detecta el ADN fragmentado a través de la incorporación catalítica de 12-dUTP-fluoresceína en los extremos 3'-OH, utilizando la enzima “Terminal deoxynucleotidyl Transferase” (TdT).

Los embriones y larvas de estadios 23 al II fueron fijados en una solución de formaldehído 4 % en buffer fosfato salino 0.1 M (PBS) durante 20 horas a 4°C, y conservados en alcohol 70° a 4°C.

Posteriormente fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes, xilol e incluídos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C). Se realizaron cortes seriados en sentido transversal, con un espesor de 6µm, utilizando un micrótomos Leitz. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos recubiertos con Vectabond (Vector) y mantenidos una semana a 30°C para su total secado.

Los cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados en una serie descendente de alcoholes, sumergidas 5' en una solución 0,85% de NaCl, lavados 5' en PBS 0,1M, pH 7.4, y refijadas en solución 4% de formaldehído en PBS durante 15'. Luego las secciones fueron lavadas en dos baños de 5' de PBS, sumergidas 2' en buffer Tris-HCl, pH 8,1, para luego ser permeabilizadas con una solución de 20µg/ml de proteinasa K (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD) en buffer Tris-HCl, pH 8.0, durante 10' a temperatura ambiente, y lavadas nuevamente durante 5' con PBS. Luego fueron refijadas 5' en solución 4% de formaldehído en PBS, lavadas en PBS e inmersas en buffer de Equilibrio (200 mM cacodilato de potasio, 25 mM Tris-HCl, 0,2 mM DTT, 0,25 mg/ml albúmina sérica bovina y 2,5 mM cloruro de cobalto) durante dos minutos.

Los portaobjetos fueron extraídos del buffer, secados alrededor de los cortes histológicos y se aplicó con micropipeta el buffer de Reacción, compuesto por una mezcla de nucleótidos (que incluye dUTP-fluoresceína y dATP), la enzima TdT y buffer de Equilibrio; los cortes fueron cubiertos con cubreobjetos de plástico e incubados durante 60' a 37°C.

Se llevaron a cabo dos tipos de controles:

- “positivos”; previamente a la aplicación del buffer de Equilibrio, algunos cortes fueron tratados con una solución de 0,5 µg/ml ADNasa I (Promega, Madison, WI) en buffer Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ y 10 mM CaCl₂, durante 10' a 37 °C. Luego fueron lavados varias veces con agua destilada y PBS, y se continuó el procedimiento; la ADNasa I es una nucleasa que produce oligonucleosomas 3'OH/5'P. Este tratamiento para la obtención de controles positivos indujo roturas inespecíficas en

el ADN de los núcleos de la mayoría de las células (por lo menos un 70%), los que dieron coloración positiva en la observación final.

- “negativos”; en el buffer de Reacción aplicado en estos cortes, se reemplazó la enzima TdT por agua destilada.

La reacción se detuvo con buffer SSC (0,3 M NaCl y 30 mM citrato de sodio, pH 7.0), durante 15' a temperatura ambiente; los portaobjetos fueron lavados en PBS y montados con un medio acuoso no permanente (0,3% propilenglicol, 30% glicerina, 0,3% azida sódica en PBS); los preparados fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Polyvar (Reichert-Jung) y fotografiados con película TMAX 400 (Kodak).

Posteriormente los preparados fueron desmontados, lavados en varios baños de PBS y de agua destilada, coloreados con hematoxilina y eosina, deshidratados y montados como se describe en la sección Análisis Histológico; de esta manera se pudo examinar el aspecto morfológico de los núcleos detectados por el método TUNEL.

RESULTADOS

PROLIFERACION CELULAR

Con el objetivo de reconocer las células proliferativas durante el desarrollo de las branquias, embriones desde el estadio 20 hasta el IV larval fueron inmunomarcados con un anticuerpo contra PCNA; la coloración granular positiva fue observada específicamente en los núcleos celulares, y no se encontraron núcleos inmunorreactivos en los controles negativos .

En los estadios 20 y 23, aunque numerosos núcleos resultaron inmunomarcados, la coloración fue de mayor intensidad en los arcos branquiales y en la parte interna de la barra branquial, similar a la encontrada en la faringe y el tubo neural (fig. 2), mientras que se encontró una reacción menor en los filamentos externos, así como en la epidermis y el opérculo.

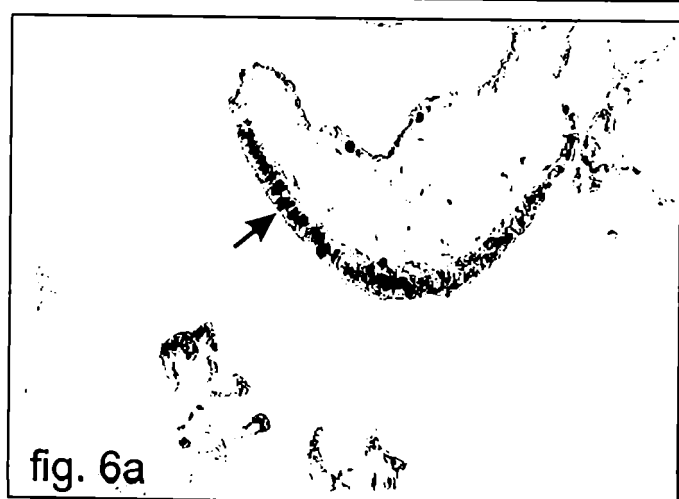
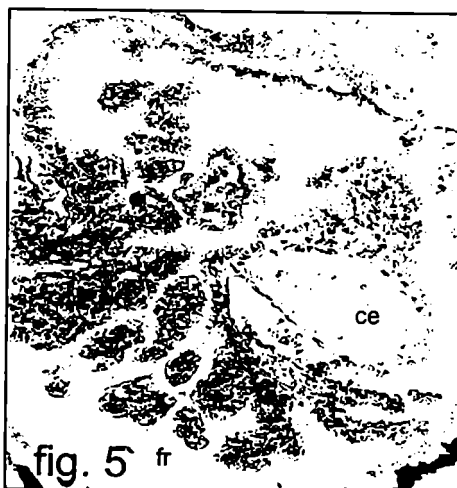
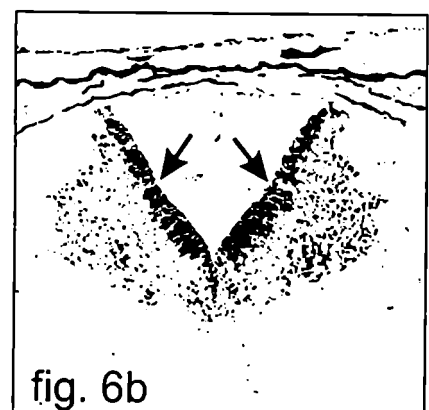
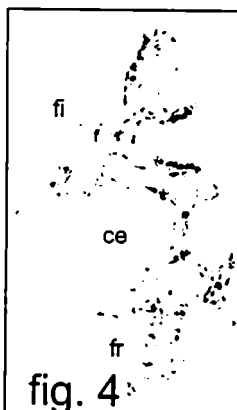
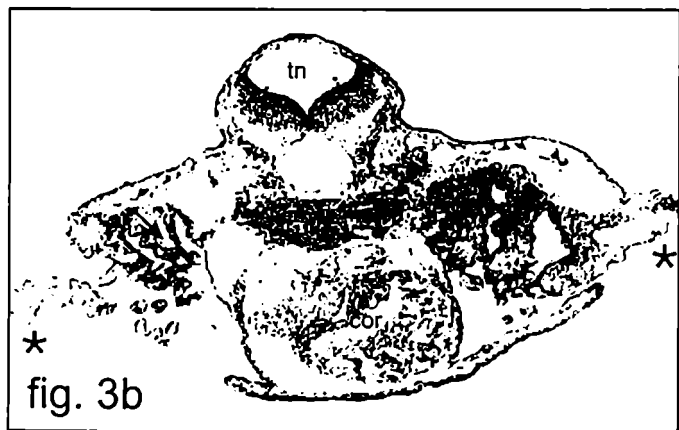
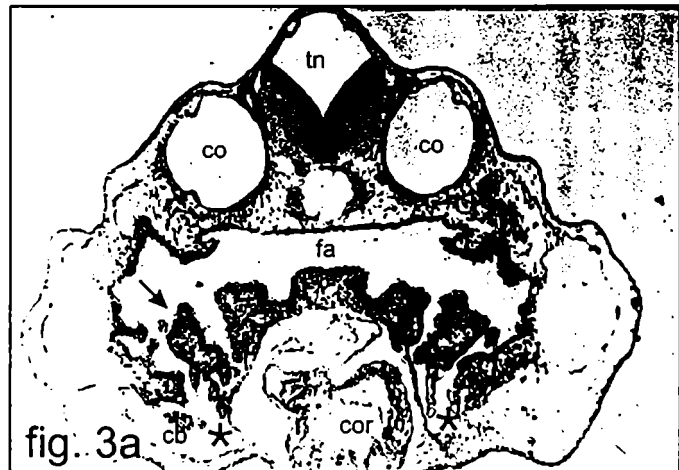
En el estadio 24 se siguió observando el mismo patrón, con una coloración intensa en el epitelio de las branquias internas que están en formación y en el epitelio faríngeo que dará origen a los velos, mientras que se detectó una marca mas suave en el tejido mesenquimático y los núcleos de los cartílagos de los arcos viscerales; la reacción fue negativa en los núcleos de los filamentos externos, que han quedado encerrados por el opérculo (fig. 3).

En el estadio I fue observada una amplia distribución de la inmunomarcación en las branquias internas en desarrollo, siendo mas intensa en las células epiteliales de los filtros y crestas (fig. 4), y en las células cilíndricas de los velos dorsales y ventral; se encontró una coloración mas débil y en algunos casos estuvo ausente en el resto del epitelio de los velos, en el tejido conectivo de las branquias, y en algunos filamentos respiratorios. No se observó inmunorreacción en los restos de los filamentos de las branquias externas.

En los estadios II y IV se detectó reacción positiva suave en numerosos núcleos del epitelio branquial y del tejido conectivo de las branquias; los ceratobranquiales ya diferenciados no presentaron coloración (fig. 5). La coloración fue intensa y frecuente en las células epiteliales cilíndricas del velo dorsal y de otras porciones del aparato filtrante, similar a la encontrada en algunos núcleos del tubo neural y de los ojos (fig. 6).

MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Algunos signos morfológicos de degeneración celular pueden ser observados a nivel del microscopio óptico a través de técnicas convencionales de coloración (Kerr et



al, 1995); con el objetivo de localizar células en proceso de muerte celular y cuerpos apoptóticos, se efectuó el análisis de cortes histológicos seriados del área branquial desde el estadio 23, en que se ha formado el opérculo y las branquias externas se encuentran plenamente desarrolladas y funcionales, hasta el estadio II larval en que han desaparecido por completo los filamentos branquiales externos.

Las células sometidas al proceso de muerte celular programada o apoptosis, presentaron un aspecto "encogido", aisladas de las células vecinas, debido a la reducción del volumen citoplasmático; también mostraron un citoplasma mas denso, homogéneo y eosinófilo que las normales, mientras que el núcleo presentó un aspecto picnótico (fig. 7a) , siendo mas frecuente su observación en los estadios 24 y 25-I en los restos de los filamentos externos. En una etapa mas avanzada del proceso, los núcleos se observaron como una esfera densa oscura, fragmentado dentro de una célula o en pequeños cuerpos apoptóticos (figs. 7b,c y d); también se encontró una acumulación de gránulos de pigmento oscuro en las células apoptóticas (fig. 7c y d), manteniéndose las células alrededor de un vaso sanguíneo activo (fig. 7a y c). Por último se observó la pérdida de los límites celulares y la presencia sólo de algunos restos celulares pigmentados (fig. 7d).

Para determinar si se produjo fragmentación oligonucleosómica del ADN durante el proceso de apoptosis en el área branquial y visualizarla *in situ*, se utilizó el método TUNEL en cortes histológicos de embriones de los mismos estadios mencionados anteriormente; de esta manera se corroboraron las observaciones morfológicas, coincidiendo la forma y localización de las células afectadas y los restos apoptóticos.

En el estadio 23 se encontraron escasos núcleos TUNEL-positivos en los filamentos externos (fig. 8); en el estadio 24, mostraron reacción positiva numerosos núcleos en los extremos de los filamentos externos (fig. 9a) y unos pocos en el opérculo (fig. 9b), mientras que no se encontraron núcleos marcados en el epitelio en diferenciación alrededor de los arcos branquiales.

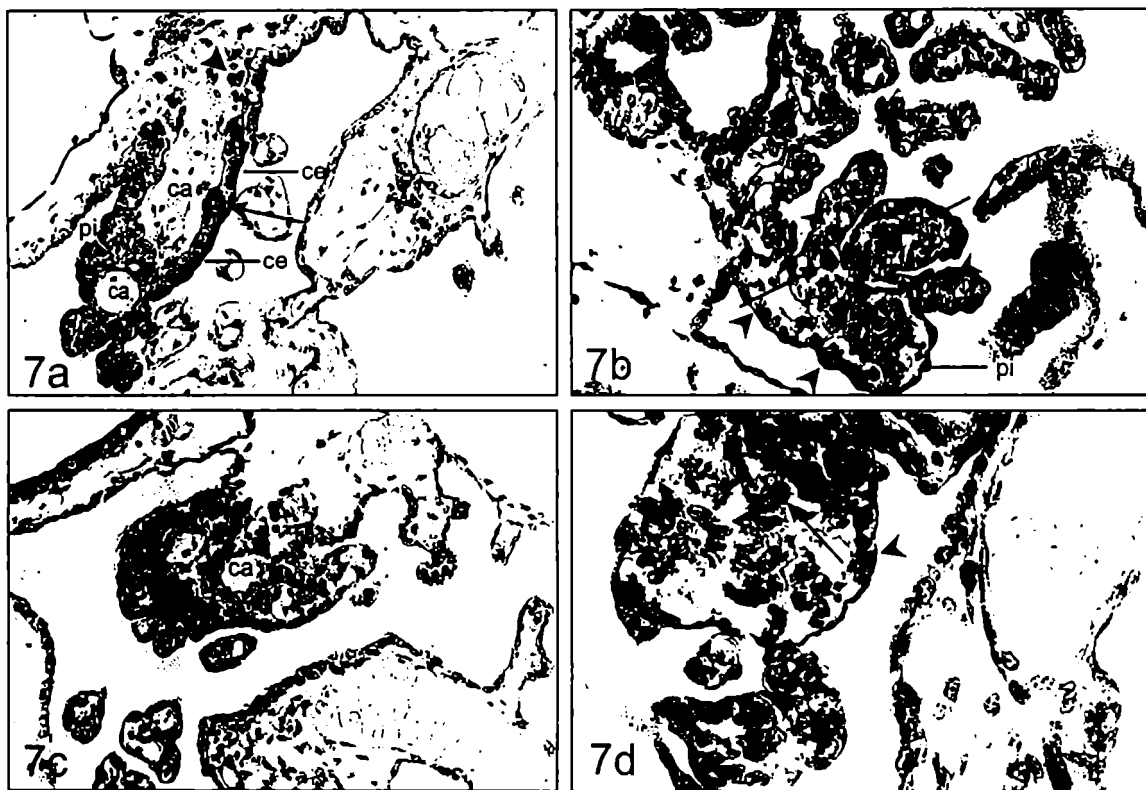


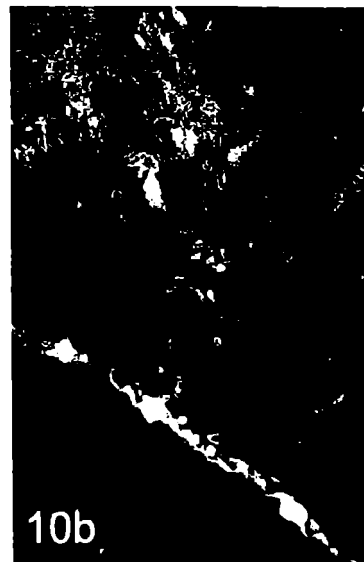
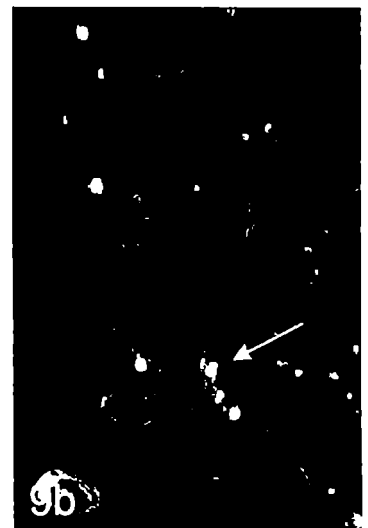
Figura 7: Cortes histológicos de los restos de branquias externas de embriones en estadios 25-I coloreados con hematoxilina-eosina (fig. a, c y d) y con tricrómico de Mallory (b).

a, b) El epitelio de los filamentos externos muestra distintos estadios de células apoptóticas; se encuentran núcleos picnóticos (pi), citoplasma denso y muy eosinófilo (ce), núcleo fragmentado (flecha), cuerpos apoptóticos (cabeza de flecha). x200. c, d) Se observan restos de células apoptóticas, los límites celulares se han perdido y se encuentra acumulación de pigmento. x200 y x800 respectivamente. ca: vaso capilar.

El estadio I presentó la mayor frecuencia de núcleos marcados e incluso de cuerpos apoptóticos, especialmente entre los restos de los filamentos externos (fig. 10); se detectaron pocos núcleos en la parte anterior de las branquias donde se encontraban en desarrollo las branquias internas y esporádicamente alguno en el opérculo (fig. 10a y b). En el área más avanzada del proceso, coincidiendo con la pérdida de los límites celulares y la acumulación de partículas pigmentadas, se detectaron numerosos fragmentos nucleares (fig. 10c y d). Estos resultados coincidieron con la pérdida de la integridad del citoesqueleto observada en la inmunomarcaciones con anticitoqueratinas, en el mismo estadio (Ver Capítulo 3).

En el estadio II bajó nuevamente la frecuencia de núcleos reactivos, y se observaron algunas inmunomarcaciones positivas en los filamentos y en los filtros branquiales (fig. 11).

La aplicación del TUNEL permitió también establecer que en los distintos estadios, la mayoría de las células afectadas eran epiteliales, ya que solo esporádicamente se observaron núcleos reactivos entre las mesenquimáticas.



DISCUSIÓN

Entre los diversos métodos disponibles para identificar células en activo proceso de síntesis de ADN a nivel histológico, la utilización de marcadores moleculares de proteínas asociadas a la proliferación (como PCNA) presenta la ventaja de realizar la inmunodetección en tejidos fijados y procesados convencionalmente.

Existen dos formas de la proteína PCNA; una es sensible a los solventes orgánicos y la otra no es afectada por los mismos (Bravo y McDonald-Bravo, 1987). La forma nucleoplásmica de PCNA es extraíble por solventes orgánicos, se encuentra en células en reposo y no está involucrada en la síntesis de ADN. La forma resistente a los solventes orgánicos se encuentra localizada en los sitios de replicación de ADN y asociada a la síntesis y reparación de ADN; esta sería la forma proteica detectada en el presente trabajo, ya que los tejidos fueron tratados con solventes orgánicos durante el procesamiento histológico utilizado.

La distribución de PCNA en células embrionarias y larvales durante el desarrollo de las branquias de *Bufo arenarum* fue determinada a través de inmunocitoquímica; los resultados obtenidos permiten relacionar su expresión con las células o tejidos en procesos de proliferación y diferenciación celular. En los primeros estadios estudiados, se encontró una gran cantidad de núcleos reactivos, que corroboran las observaciones histológicas: las células se presentan en activa división y diferenciación, especialmente en los arcos y epitelios branquiales, con gran cantidad de plaquetas vitelinas y gránulos de pigmento que disminuyen progresivamente hacia el estadio I; en este estadio, mientras se encuentra una intensa reacción en los tejidos de las branquias internas, se observa ausencia total de coloración en los filamentos externos. En los estadios II y IV, tanto los epitelios branquiales como los velos y el tejido conectivo muestran expresión de PCNA; en los estadios mas

avanzados, la detección es esporádica en los distintos tejidos branquiales, siendo frecuente en los velos dorsales. Estos velos tienen una importante función en el filtrado de partículas tanto para la alimentación de la larva como para evitar su pasaje al tejido respiratorio; esta actividad mecánica provocaría un desgaste acentuado del epitelio, que sería compensado con una alta tasa de recambio celular.

El proceso de muerte celular observado durante la degeneración de las branquias de *Rana pipiens* ha sido descrito como una necrosis o atrofia producida por autólisis, basado en la presencia en las células degenerativas de grandes vacuolas autofágicas conteniendo fosfatasa ácida lisosomal (Michaels *et al*, 1971); sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y con los conocimientos actuales acerca de esta temática, se puede afirmar que la regresión de los filamentos branquiales externos en *Bufo arenarum* corresponde al proceso denominado apoptosis o muerte celular programada (Wyllie *et al*, 1981; Clarke, 1990). Aunque este tipo de muerte celular se ha encontrado en algunos casos durante la metamorfosis y remodelación de tejidos larvales (Tata, 1994; Grassi Milano y Chimenti, 1995; Nishikawa y Hayashi, 1995; Shi, 2000), no había sido implicada hasta el momento en la degeneración de las branquias embrionarias.

La muerte celular programada juega un rol primordial durante la ontogénesis normal, participando en la eliminación selectiva de células en los tejidos en formación (Mori *et al*, 1994; Grassi Milano y Chimenti, 1995) e incluso de órganos enteros durante el desarrollo (Tata, 1994; Shi, 2000). A diferencia de los resultados observados en urodelos, donde las branquias externas son funcionales hasta la metamorfosis, la especialización funcional de las branquias internas a lo largo de la evolución de los anuros se encuentra asociada a la desaparición de las branquias externas, las que son innecesarias una vez que las internas comienzan a formarse.

Las observaciones histológicas realizadas en las células degenerativas de las branquias externas de *Bufo arenarum* coinciden con algunos de los cambios morfológicos característicos de la muerte celular programada descritos

anteriormente (Wyllie, 1981; Koseki *et al*, 1992; Kerr *et al*, 1995; Bredesen, 1995): reducción del volumen celular, formación de protuberancias en la superficie celular, condensación, indentación y fragmentación nuclear, así como agrandamiento del nucleolo. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones efectuadas en las branquias de *Rana pipiens* (Michaels *et al*, 1971), y con descripciones realizadas durante la regresión de algunos órganos durante la metamorfosis, como el páncreas (Grassi Milano y Chimenti, 1995) y células epiteliales del intestino, epidermis y la cola de varios anuros (Shi, 2000). Las variaciones morfológicas fueron corroboradas con algunos resultados inmunocitoquímicos durante los estadios que presentaron mayor frecuencia de núcleos apoptóticos : en el estadio I, no solo estuvo ausente inmunocoloración para PCNA en los filamentos externos, sino que la pérdida de límites celulares es contemporánea con la disminución o ausencia de inmunorreacción a distintas citoqueratinas, las cuales son marcadores moleculares de uniones intercelulares típicas de epitelios (desmosomas y hemidesmosomas) (Franke *et al*, 1984) (ver Capítulo 3).

En cuanto a los aspectos bioquímicos de la muerte celular, ha sido sugerido que la fragmentación internucleosomal de ADN a través de una endonucleasa endógena no debería considerarse como una evidencia definitiva de apoptosis (Ueda y Shah, 1994); sin embargo otros autores han reportado que en numerosos tipos epiteliales que sufren el proceso de apoptosis, el ADN siempre es clivado en fragmentos entre 50 y 300 kbp, independientemente de la subsecuente fragmentación internucleosomal (Oberhammer *et al*, 1993). El método TUNEL ha probado ser eficaz en la detección específica de ADN fragmentado en núcleos y cuerpos apoptóticos de distintos tipos celulares durante este proceso (Gavrieli *et al*, 1992; Mori *et al*, 1994; Turecková *et al*, 1996; Rojo y Gonzalez, 1998); por otra parte, se ha sugerido que es necesario completar los resultados del TUNEL con observaciones morfológicas y/o ultraestructurales. En el presente trabajo, la aplicación de este método ha permitido confirmar diversos aspectos morfológicos

descriptos; se han identificado núcleos en estadios temprano y medio de muerte celular (condensación, indentación y fragmentación) contemporáneamente con la ausencia de marcadores de actividad nuclear (PCNA), mientras que en estadios tardíos se comprobó la presencia de ADN entre los restos de tejido en degeneración. Estos resultados también coincidieron con la anteriormente mencionada pérdida de la integridad del citoesqueleto.

Se considera que la apoptosis se encuentra bajo un control genético, el cual es expresado a través de factores apropiados (Kroemer *et al*, 1995; Bredesen, 1995). Durante la metamorfosis, un proceso que se encuentra bajo estricto control hormonal, la tiroxina es el factor inductor de la muerte celular de las branquias internas de anuros y de las branquias externas de urodelos, así como de otros órganos larvales (Fox, 1983; Tata, 1994; Shi, 2000); los resultados obtenidos en células musculares apoptóticas durante la metamorfosis, han demostrado que la T_3 induce la fragmentación internucleosomal de ADN (Nishikawa y Hayashi, 1995). Durante el período en que comienza la degeneración de las branquias externas de anuros, los niveles de tiroxina son muy bajos y la glándula tiroidea aún no es funcional (Fox, 1983). Recién a partir del estadio I se supone que comienza la actividad sintética en la tiroides de *Bufo arenarum* (Miranda, 1995), en coincidencia con las observaciones efectuadas en *Xenopus laevis*, donde el estadio 46 (homólogo al estadio I de *B. arenarum*) es el mas temprano capaz de exhibir respuesta morfológica y bioquímica ante el aporte exógeno de T_3 (Tata, 1994), mientras que las tiroides recién comienzan la secreción de T_3 y T_4 en el estadio 53-54 larval (Tata *et al*, 1993). La base molecular implicada en esta temprana competencia celular al programa metamórfico es la avanzada expresión de receptores de hormona tiroidea en estadios embrionarios (Tata, 1994).

Un gran número de genes han sido identificados en la última década, cuyos productos de expresión tienen un rol determinado en los procesos de apoptosis o muerte celular programada (Bredesen, 1995; Kroemer *et al*, 1995; Shi, 2000).

también se ha comenzado a identificar algunos genes implicados en la regresión orgánica durante la metamorfosis de *Xenopus laevis* (Tata, 1994) y *Rana japonica* y *catesbeiana* (Shi, 2000); las muertes celulares observadas en la cola y el intestino de los anuros durante la metamorfosis comparten características morfológicas y genéticas. Ambas pueden ser inhibidas por el immunosuppressant CsA y las caspasas, sugiriendo patrones similares a los observados durante la apoptosis en mamíferos; también se han encontrado dos miembros de la familia *bcl-2* en *Xenopus laevis*, y se ha implicado a *bax* en la muerte de células musculares de la cola. Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado la expresión de estos genes en estadios mas tempranos que los involucrados en la metamorfosis.

El área de muerte celular en las branquias externas progresa a lo largo del eje rostro-caudal en un sentido posterior a anterior, la misma dirección del gradiente de muerte celular observad en el músculo dorsal y la cola de larvas de *Xenopus laevis* durante la metamorfosis (Nishikawa y Hayashi. 1995). Existen otros gradientes axiales pero de sentido antero-posterior determinados en el desarrollo de los anuros, como el de diferenciación durante la embriogénesis temprana (Niewkoop y Faber, 1956; Radice *et al*, 1989) y el de proliferación celular y expresión génica durante la metamorfosis (Nishikawa y Hayashi, 1994). El gradiente de muerte celular observado en dirección opuesta al de diferenciación y proliferación podría ser el resultado de la presencia de un gradiente descendente antero-posterior de algún inhibidor de muerte celular; para determinarlo sería necesario estudiar el patrón de expresión de factores inhibitorios de muerte celular como el *bcl-2* o *bclx_L* a lo largo del eje axial. En el caso del proceso de metamorfosis, se ha encontrado una diferencia regional en la expresión de los receptores β de T_3 , la que podría ser responsable del gradiente de muerte celular durante los cambios metamórficos (Yaoita y Brown, 1991).

Durante la metamorfosis, se encuentra claramente establecido que la muerte celular observada en diversos órganos, como la cola y el epitelio intestinal, son dependientes del accionar de las hormonas tiroideas (Shi, 2000). Por lo expuesto

hasta aquí, se desconoce cual puede ser el factor inductor de la regresión branquial en una etapa tan temprana de la embriogénesis; la solución a este cuestionamiento se encontrará en la determinación de productos de expresión temprana de alguno de los genes implicados en la muerte celular programada. Por lo tanto, es necesario realizar estudios celulares y moleculares exhaustivos para dilucidar el rol de potenciales promotores y reguladores de la apoptosis durante la embriogénesis.

En resumen, la muerte celular programada en los filamentos branquiales externos de *Bufo arenarum* se verifica en forma independiente a la acción de hormonas tiroideas y representa un excelente modelo para posteriores estudios de apoptosis en sistemas hormono-independientes.

Capítulo 3

EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE PROTEINAS DEL CITOESQUELETO DURANTE EL DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS

INTRODUCCION

El desarrollo de un organismo implica la obtención de células especializadas a través del proceso de *diferenciación* y la organización en grupos multicelulares (tejidos y órganos) mediante la *morfogénesis*.

La morfogénesis involucra tanto cambios dramáticos en la forma celular, como así también, la relocalización de grupos celulares, incluyendo la migración de algunas células, en ocasiones a lo largo de grandes distancias.

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma otorgando rigidez y estabilidad a las células, y participando en la distribución de las organelas; también de él depende la capacidad de las células de adoptar una gran variedad de formas así como la de efectuar movimientos coordinados y direccionales.

Aunque existen otras moléculas proteicas asociadas, los elementos principales del citoesqueleto se distinguen en tres tipos de acuerdo al diámetro que presentan: los microfilamentos (6-7 nm), los filamentos intermedios (8-11 nm) y los microtúbulos (22-25 nm) (Hilfer y Searls, 1986; Browder *et al*, 1991; Alberts *et al*, 1992; Nagle, 1994). Estos elementos se encuentran en estrecho contacto en la célula, constituyendo un verdadero armazón cuyas piezas están interrelacionadas y sus funciones coordinadas.

El citoesqueleto se encuentra involucrado en una variedad de cambios de la forma celular durante la organogénesis (Hilfer y Searls, 1986); por otra parte, el citoesqueleto de una célula puede afectar al de sus vecinas, ya sea a través de las uniones intercelulares o bien modificando la matriz extracelular. De esta manera, este complejo proteico juega un rol clave en un gran número de cambios morfológicos coordinados durante el desarrollo de tejidos y órganos.

Microfilamentos

Los microfilamentos son polímeros constituidos a partir de subunidades de la proteína contráctil actina, una de las mas abundantes en las células eucariotas; los microfilamentos pueden encontrarse en forma individual como la F-actina estructural, conformando un retículo en el citoplasma celular, constituyendo una red densa bajo la membrana plasmática (la corteza celular), o agrupados en un haz que corre a lo largo de la célula, como la actina de los músculos liso, esquelético y cardíaco.

En los tejidos epiteliales y en algunos otros tipos celulares, la red de microfilamentos de actina se encuentra asociada a uno de los tipos de uniones celulares, la *zonula adherens* (Schäffer *et al*, 1993); además se ha sugerido que los microfilamentos participan en la formación de pliegues epiteliales y el “branching” (Browder *et al*, 1991).

Existen distintas proteínas que se pueden encontrar asociadas a la actina durante el desarrollo embrionario; una de las principales es la miosina, la que se encuentra en bajos niveles asociada a los microfilamentos en los tejidos no musculares (Alberts *et al*, 1992). La miosina citoplasmática no presenta reacción cruzada con los anticuerpos contra miosina sarcomérica, aunque ambas presentan la misma estructura: dos cadenas pesadas de 200000 Mr, dos cadenas livianas de 20000 Mr y otras dos de 15000-17000 Mr (Hilfer y Searls, 1986).

Microtúbulos

Los microtúbulos están constituidos por protofilamentos de moléculas de tubulina, los cuales son heterodímeros formados por subunidades proteicas denominadas α -tubulina y β -tubulina. Además de ser parte esencial en una amplia variedad de mecanismos celulares conocidos, como por ej. en la mitosis donde conforman el huso mitótico, y en la movilidad celular a través de los cilios y flagelos,

también los microtúbulos tienen importancia crucial en el control de la forma de las células.

Aunque todos los componentes del citoesqueleto participan en la geometría celular, los microtúbulos desempeñan un papel exclusivo en su determinación; se encuentran involucrados en las translocaciones de organelas en el citoplasma (Hilfer y Searls, 1986), en la distribución de los microfilamentos y los filamentos intermedios (Alberts *et al*, 1992), juegan un rol fundamental en el establecimiento de la polaridad celular y en la generación y mantenimiento de la asimetría celular de las células migratorias (Mandelkow y Mandelkow, 1995).

En las células epiteliales, los microtúbulos se encuentran organizados de diferentes maneras, de acuerdo con el tipo celular; en las células cuboides, son cortos y distribuidos al azar, mientras que en las columnares o cilíndricas, se encuentran organizados en haces que corren a lo largo del eje principal (Browder *et al*, 1991).

Filamentos Intermedios

Los filamentos intermedios (FIs) constituyen una familia supergénica de proteínas fibrosas que se encuentran en el citoplasma, y en el nucleoplasma formando parte de la lámina nuclear de la célula, en donde constituyen una red que conecta el núcleo con la membrana celular (Steinert y Liem, 1990; Nagle, 1994; Klymkowsky, 1995; Goldman *et al*, 1996). La organización de la red de los FIs así como sus propiedades observadas *in vitro*, sugieren su participación en el mantenimiento de la integridad citoplasmática y la forma celular, el establecimiento de sitios específicos de las organelas y otros elementos estructurales, así como resistencia al stress mecánico (Albers y Fuchs, 1992; Goldman *et al*, 1996). Si bien se encuentran en todos los tipos celulares, los FIs son particularmente prominentes en los lugares donde las células están sometidas a tensión mecánica, como es el caso de los epitelios, a lo largo de los axones y en el

citoplasma de las células musculares lisas. Además, los cambios producidos en la distribución de los filamentos intermedios durante la embriogénesis han sido correlacionados con su participación en los movimientos morfogénéticos y en la morfología celular (Browder *et al*, 1991).

Las subunidades de los FIs, a diferencia de los microtúbulos y microfilamentos, son proteínas fibrosas particularmente estables e insolubles en soluciones iónicas y detergentes; están formados por polipéptidos de diversos tamaños, desde 40000 a 200000 daltons aproximadamente (Tabla 1). A pesar de las grandes diferencias de tamaño, todas estas proteínas son codificadas por miembros de la misma familia multigénica; cada cadena polipeptídica contiene una región central altamente conservada de unos 310 aminoácidos en los FIs citoplasmáticos y de unos 350 en las lamininas nucleares, que forman una hélice α , interrumpida por cuatro segmentos no helicoidales. Los dominios N y C terminales no helicoidales son extremadamente variables en tamaño, volumen y composición aminoacídica. Estas regiones de la molécula son las que proveen inmunogenicidad y especificidad funcional a cada proteína FI. En base a su secuencia de aminoácidos, reactividad antigénica y homologías químicas, los FIs se han agrupado en cinco o seis categorías, según distintos autores (Nagle, 1994; McLean y Lane, 1995), que se encuentran asociados con distintos tipos celulares (Tabla 1).

TIPO DE FILAMENTO INTERMEDIO	FILAMENTO INTERMEDIO	PESO MOLECULAR (daltons)	LOCALIZACIÓN CELULAR
Tipo I	Citoqueratinas ácidas	40.000 - 68.000	
	9 a 19		células epiteliales , epidérmicas
Tipo II	Citoqueratinas básicas y	40.000 - 68.000	y derivados como pelos y uñas
	Neutras - 1 a 8		
Tipo III	Desmina	53.000	células musculares
	Vimentina	57.000	células mesenquimáticas y derivadas
	Proteína ácida fibrilar glial	55.000	células gliales (astrocitos y algunas
			células de Schwann)
	Periferina	58.000	algunas neuronas
Tipo IV	Neurofilamentos H, M, L	68.000 - 200.000	Neuronas
	Alfa-internexin	66.000	axones de muchas neuronas
Tipo V	Lamininas nucleares A y C	60.000 - 80.000	lámina nuclear
Tipo VI	Nestina	200.000	"stem cells" neuronales

TABLA 1: Filamentos intermedios agrupados según homologías químicas y estructurales, modificado de Nagle (1994).

Citoqueratinas y Vimentina

Las citoqueratinas son una familia de aproximadamente veinte proteínas que se encuentran típicamente en las células epiteliales (Franke *et al*, 1981, 1984; Moll *et al*, 1982); han sido separadas en base a su tamaño (40-68 kDa) y punto isoelectrico y numeradas de 1 a 20 por Moll y colaboradores (1982) (Tabla 2). Recientemente otras diez proteínas han sido descritas, pero restringidas al pelo, las uñas, y algunas papilas linguales (Nagle, 1994; Klymkowsky, 1995). Las citoqueratinas incluyen dos subfamilias, las ácidas o tipo I (ck 9 a 19) y las neutras o básicas o tipo II (ck 1 a 8) (Moll *et al*, 1982, 1990; Franke *et al*, 1984; Quinlan *et al*, 1985; Sun *et al*, 1984). Los filamentos de citoqueratinas son siempre heteropolímeros formados por subunidades tetraméricas, constituidas por heterodímeros de una molécula ácida y una básica (Nagle, 1994).

CITOQUERATINA (Nro)	PESO MOLECULAR (kDa)	EPITELIOS
1	65	Queratinizados
2	67	Queratinizados
3	64	Córneo
4	59	estratificados no queratinizados
5	58	Estratificados
6	56	keratinocitos proliferantes, folículos pilosos, células epit. en cultivo
7	54	simples y algunos estratificados
8	52	simples, hepatocitos
9	64	epidermis de los pies
10	56,5	Queratinizados
11	56	epidermis , epidermis de los pies
12	55	Córneo
13	54	estratificados no queratinizados
14	50	Estratificados
15	50	Estratificados
16	48	keratinocitos proliferantes, folículos pilosos, células epit. en cultivo
17	46	simples y algunos estratificados
18	45	simples, hepatocitos
19	40	casi todos los epitelios no epidérmicos
20	46	fovea gástrica e intestinal, urotelio, cél. de Merkel, timo, próstata

Tabla 2: Tipos de citoqueratinas según su peso molecular y epitelios en que se encuentra su expresión. Modificado de Moll *et al* (1982)

Las citoqueratinas son excelentes marcadores de patrones de diferenciación epitelial ya que cada tipo epitelial expresa característicamente una serie de 2 a 10 proteínas (Sun *et al*, 1984; Nagle, 1994), variando incluso dentro de un epitelio de acuerdo con el tipo celular, la fase del desarrollo embrionario, el estadio de diferenciación, la fase de un proceso de muerte celular y el medio ambiente celular. Las citoqueratinas ácidas han sido, desde el punto de vista filogenético, las primeras citoqueratinas expresadas, mientras que las básicas son

consideradas mas evolucionadas y se encuentran en epitelios estratificados (Markl y Franke, 1988; Albers y Fuchs, 1992).

Generalmente los epitelios simples expresan entre dos y cuatro de las citoqueratinas mas pequeñas (ck 7, 8, 18 y 19), mientras que los epitelios estratificados escamosos estan caracterizados por la presencia de polipéptidos grandes, principalmente ck 1 a 6 y de la 9 a 17, variando la combinación de acuerdo con la ubicación en los estratos, el estadio de diferenciación y el grado de keratinización (Doran *et al*, 1980; Tseng *et al*, 1982; Heid *et al*, 1988) (Ver Tabla 2). Aunque los distintos epitelios de una especie expresan diferentes combinaciones de citoqueratinas, estas incluyen siempre una subunidad del tipo ácido y una de tipo básico (Fuchs *et al*, 1981, 1987; Sun *et al*, 1984; Quinlan *et al*, 1985).

Durante el desarrollo embrionario de los anfibios y a partir de la especificación de las tres hojas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), la diferenciación de todos los tipos celulares larvales dependen de las interacciones producidas entre estas láminas primordiales. Las citoqueratinas pueden ser excelentes indicadores de diferenciación epitelial durante la embriogénesis de anfibios, ya que han sido descriptos como los marcadores moleculares de células específicas disponibles mas tempranamente durante el desarrollo embrionario (Jamrich *et al*, 1987). Los resultados obtenidos durante el desarrollo de *Xenopus laevis* muestran que la expresión de citoqueratinas es similar al patrón de síntesis encontrado durante el desarrollo de mamíferos (Fouquet *et al*, 1988). Los epitelios de tipo simple durante la embriogénesis sintetizan citoqueratinas equivalentes a las 8, 18 y 19 de humanos, que tambien se encuentran expresadas en varios epitelios simples y el endotelio de los animales adultos.

Además de formar parte del citoesqueleto de las células epiteliales, los filamentos de citoqueratinas tambien se encuentran asociados con un tipo de unión intercelular, la *maculae adherens*, siendo conocidos en este caso como tonofilamentos (Browder *et al*, 1991).

La vimentina es una proteína de 52 kDa que constituye filamentos homopolímeros, al igual que los otros FIs de su grupo (III), de un diámetro promedio de 10 nm (Nagle, 1994). Aunque es estructuralmente similar a la desmina y a la proteína ácida fibrilar glial, inmunológicamente se comporta en forma distintiva. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que los filamentos de vimentina forman una red ondulada de filamentos en el citoplasma de los fibroblastos, la cual está asociada a las membranas nuclear y plasmática (Franke *et al*, 1978)

La vimentina se encuentra expresada generalmente en células de origen mesenquimático, y coexpresada con citoqueratinas en algunas células epiteliales, incluyendo el mesotelio, el epitelio tiroideo, células de la granulosa del ovario y el endometrio, y con otras de diversos orígenes en cultivos celulares (Nagle, 1994).

Durante el desarrollo embrionario se observa una clara progresión en el patrón de expresión de los FIs (Klymkowsky, 1995); en el embrión temprano, se expresan en primer lugar las citoqueratinas de epitelios simples (ck 8, 18 y 19). A medida que las células continúan su diferenciación se interrumpe la expresión de alguna de ellas y comienzan a expresarse otras proteínas FIs. En las células no epiteliales, un patrón de expresión común es la aparición inicial de vimentina, seguida por la de FIs específicos del tejido y la posterior desaparición de la primera.

OBJETIVOS

Si bien existen estudios referidos a los patrones de expresión de FIs durante la embriogénesis de anfibios, éstos han estado limitados a *Xenopus laevis*; además, no existen trabajos al respecto durante los procesos de diferenciación branquial, ya que precisamente *X. laevis* no posee branquias internas. Este tipo de estudio puede aportar resultados por demás interesantes, dado que en el desarrollo de las

branquias se encuentran involucrados distintos tipos celulares provenientes de las tres hojas embrionarias (Ver Capítulo 1).

En base a lo expuesto, hemos realizado un análisis de la expresión de diversas proteínas del citoesqueleto durante el desarrollo de las branquias externas e internas, con el fin de determinar los eventuales cambios en la presencia y distribución de las mismas, particularmente en el epitelio branquial; para ello se han aplicado técnicas inmunocitoquímicas, utilizando anticuerpos contra proteínas conformantes de los filamentos intermedios, los microtúbulos y los microfilamentos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Obtención y Mantenimiento de Animales Adultos

Ver Capítulo 1.

Obtención y Mantenimiento de Embriones

Ver Capítulo 1.

METODOS DE ESTUDIO

Técnicas Inmunocitoquímicas

Los embriones y larvas fueron fijados por inmersión en distintas soluciones de acuerdo con el anticuerpo a aplicar posteriormente en la inmunomarcación.

- líquido de Bouin durante 3 hs (90' a 4° C y 90' a temperatura ambiente), luego los ejemplares fueron lavados y conservados en alcohol 70° a 4° C.
- líquido de Dent (20 % de dimetil sulfóxido en metanol) durante 20 hs a 4° C, luego los ejemplares fueron conservados en metanol a 4° C.

Para la detección de proteínas componentes de los microfilamentos y microtúbulos, se utilizó material fijado en Bouin, mientras que para los filamentos intermedios, la fijación en el líquido de Dent permitió obtener una adecuada inmunocoloración.

El detalle y la procedencia de los anticuerpos utilizados se encuentran en la Tabla 3.

ANTICUERPO	ORIGEN	ESPECIFICIDAD	ORIGEN ANTÍGENO
Anti-Actin (monoclonal)	Sigma	actina	ameba
Anti-Actin (policlonal)	Sigma	actina	péptido c11
anti- α -Sarcomeric Actin	Sigma	actina sarcomérica	conejo
Anti-Skeletal Myosin	Sigma	miosina	humano
anti- α -Tubulin	Sigma	α tubulina	pollo
anti- β -Tubulin	Sigma	β tubulina	rata
Type II Ks pan 1-8	Progen	ck tipo II (básicas)	humano
anti-Cytokeratin 8.13	Sigma	ck 1,5,6,7,8,10,11,18	bovino
anti-Cytokeratin Peptide 8	Sigma	ck 8	humano
anti-Cytokeratin Peptide 18	Sigma	ck 18	humano
anti-Cytokeratin Peptide 7	Sigma	ck 7	humano
anti-Cytokeratin 4.62	Sigma	ck 19	humano
anti-Cytokeratin Peptide 14	Sigma	ck 14	humano
anti-Cytokeratin Peptide 13	Sigma	ck 13	humano
anti-Cytokeratin Peptide 4	Sigma	ck 4	humano
NCL-VIM	Novocastra	Vimentina	bovino

Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados.

Una vez fijados los ejemplares fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes, mezcla de alcohol-xilol y por último dos baños de xilol, e incluídos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C).

De las piezas seleccionadas se realizaron cortes seriados en sentido transversal, con un espesor de 6µm, utilizando un micrótomos Leitz. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos y mantenidos una semana a 30°C para su total secado.

Las secciones fueron desparafinadas en xilol, hidratadas en una serie descendente de alcoholes y en buffer fosfato salino 0,1 M (PBS), pH 7.4, durante 30'. Para inhibir la actividad de peroxidasas endógenas, los cortes fueron tratados con una solución de 3% de H₂O₂ en PBS durante 10', y lavados en PBS varias veces. Para bloquear eventual actividad inespecífica de otras proteínas, los cortes fueron inmersos en una solución 5% de leche descremada, 0,02 % de Tritón X-100 en PBS durante 40', y lavados en PBS.

Los anticuerpos primarios (Tabla 3) fueron diluídos en concentraciones adecuadas en PBS y aplicados sobre las secciones histológicas con una jeringa Hamilton o con micropipeta; los preparados fueron incubados en cámara húmeda a 4°C durante 20h.

Se efectuaron dos tipos de "controles negativos" para probar la especificidad de los anticuerpos primarios:

- aplicación del anticuerpo primario adsorbido previamente con el antígeno correspondiente;
- omisión del anticuerpo primario y aplicación de PBS en su lugar.

Después de enjuagarlos en PBS, fueron tratados nuevamente con la solución de leche descremada y Triton durante 60' y luego pasados nuevamente a PBS.

Se utilizaron dos métodos de detección inmunocitoquímica: inmunofluorescencia indirecta e inmunoperoxidasa.

En el caso de la técnica de inmunofluorescencia, se aplicó el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (fluoresceína o rodamina) diluido en PBS, y se incubaron las secciones en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 60'. Luego fueron lavados en PBS y montados con un medio acuoso no permanente (0,3% propilenglicol, 30% glicerina, 0,3% azida sódica en PBS); los preparados fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Polyvar (Reichert-Jung) y fotografiados con película TMAX 400 (Kodak).

En el caso de la técnica de inmunoperoxidasa, se aplicó el método avidina-biotina, utilizando Extravidina (Sigma) o el kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA); las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con el anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido en PBS, durante 30-60' a temperatura ambiente, lavadas en PBS, e incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, 30-60' a temperatura ambiente. Luego los preparados fueron lavados en PBS y revelados con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Vector) y H₂O₂ para detectar la peroxidasa; la inmunoloración observada utilizando DAB es marrón, mientras que en el caso del AEC, la coloración es roja.

El seguimiento del proceso de revelado se llevó a cabo en el microscopio, y la reacción fue detenida en agua destilada, las secciones deshidratadas en una serie ascendente de alcoholes, clarificadas en xilol y montados con el medio sintético DPX (Fluka, Suiza). Los preparados fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Polyvar (Reichert), utilizando película TMax 100 (Kodak), Kodak Gold 100 o Fujicolor 100.

RESULTADOS

En orden de estudiar la expresión y distribución del citoesqueleto en los tejidos branquiales, se efectuaron inmunomarcaciones con anticuerpos contra actina, miosina, tubulinas, citoqueratinas y vimentina desde el estadio 19 embrionario hasta el VIII larval. En los resultados inmunorreactivos se han incluido observaciones efectuadas en otros órganos que se desarrollan junto a las branquias y que en algunos casos han servido como controles positivos.

Actina

La inmunomarcación en los primeros estadios resultó positiva en todas las células embrionarias y especialmente en las células ciliadas, con una coloración suave y difusa; en el estadio 23 la inmunocoloración resultó intensa en las células mesenquimáticas y suave en las epiteliales, musculares y en corazón. En el estadio I se observó nuevamente una reacción de mayor intensidad en el conectivo, y suave en los epitelios de los filamentos internos en desarrollo, en los restos de los filamentos externos, en los mesotelios y en las células ciliadas de la epidermis. A partir del estadio II se encontró la misma reacción positiva en el tejido conectivo, en los músculos branquiales y en el corazón, la que se intensificó en los siguientes estadios; la inmunorreacción positiva en los epitelios branquiales se mantuvo uniforme a través de los estadios larvales (Fig. 1).

Actina sarcomérica

En los estadios 19 y 20-21 la reacción fue negativa en el área branquial, pero se encontró una coloración suave en los miótomos; en el estadio 23 la inmunocoloración fue intensa y definida en los miótomos y no se detectó reacción en el corazón. La misma coloración se obtuvo en los estadios 24 y I. En los estadios mas avanzados, la expresión fue detectada en los músculos constrictores de las branquias, en las células ciliadas de los velos y en el corazón; la reacción resultó negativa en los endotelios (Fig.2).

Miosina

En los estadios 19, 20 y 23 la reacción fue negativa en todos los tejidos; a partir del estadio 24 se observa expresión en el mesénquima, la que se intensifica en el estadio I y permanece en el tejido conectivo en los estadios mas avanzados (Fig. 3).

α -Tubulina

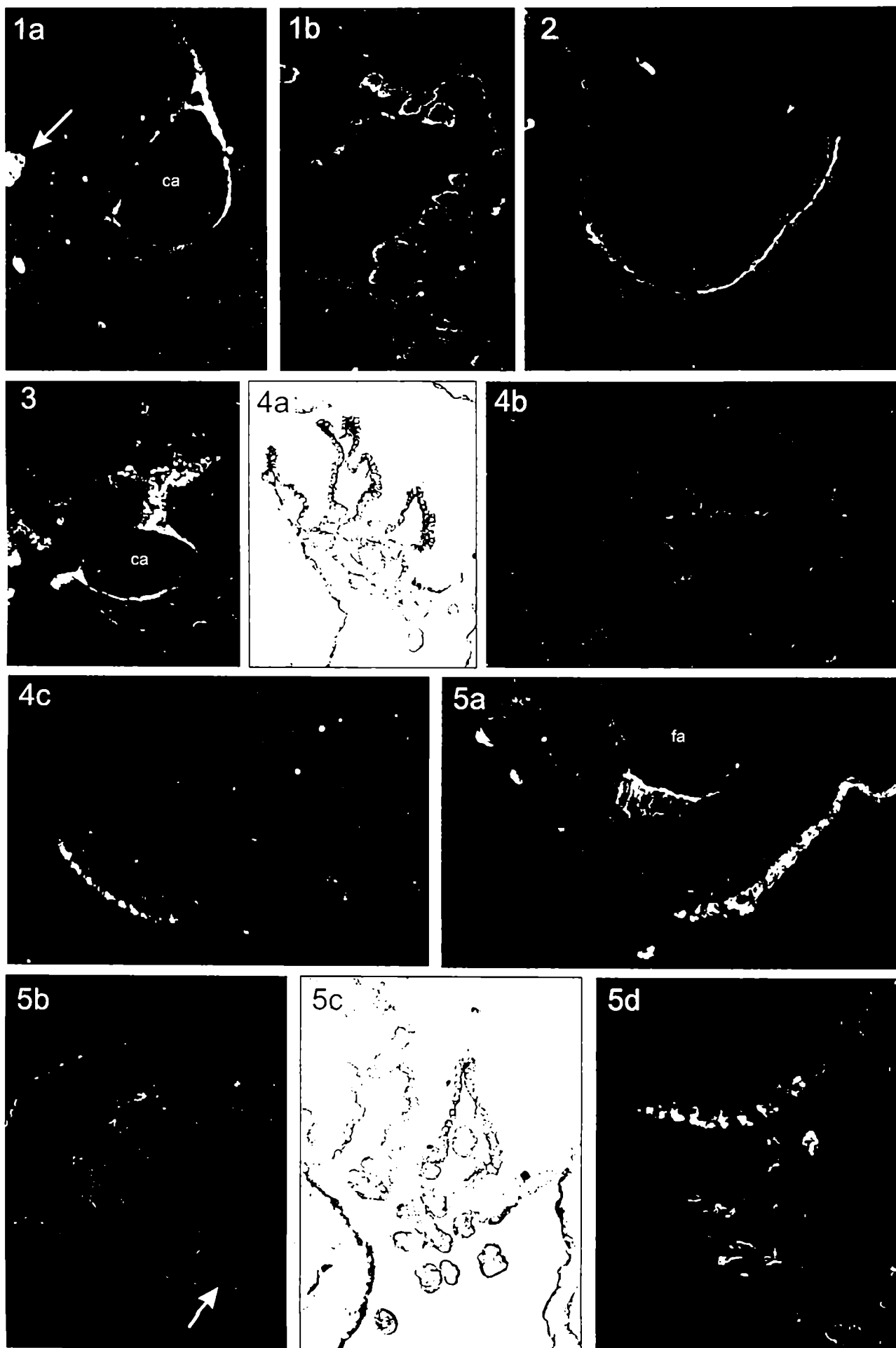
En el estadio 19 la inmunoreacción se observó difusa en las células ecto y mesodérmicas, mientras que en las células ciliadas de la epidermis resultó intensa y bien definida. En el estadio 20-21 también fue observada la coloración como un punteado intracitoplasmático en los epitelios branquiales de origen endo y ectodérmicos y en los endotelios de los capilares y en el tubo neural; en las células ciliadas se encontró la misma reacción que en el estadio anterior. En el estadio 23 la coloración se mostró definida en las células de los epitelios branquiales, las células ciliadas de la epidermis de los filamentos externos, en la faringe y el tubo neural; también se observó una reacción difusa en las células de origen ecto y mesodérmicos. En los estadios 24 y I la inmunocoloración se presentó en diversos tejidos: la mayor intensidad se observó en las células ciliadas de los velos y de la epidermis, y en el tubo neural; con una intensidad menor se encontró reacción positiva en el epitelio del techo de la cavidad branquial y los mesotelios, en el opérculo y los epitelios de los filtros y crestas branquiales (Fig. 4a). La reacción fue negativa en el mesénquima y otras células de origen mesodérmico. En los siguientes estadios el patrón de expresión se repitió en los mismos tejidos, aunque la coloración fue de menor intensidad (Fig. 4b y c).

β -tubulina

La inmunomarcación en el estadio 19 se observó bien definida y localizada en la periferia celular, a diferencia de la α -tubulina; principalmente se detectó expresión en el ecto y mesodermo, practicamente no se encontró reacción en el endodermo. La inmunocoloración fue intensa en las células ciliadas y el tubo neural. En el estadio 20-21 se observó reacción positiva en las células ciliadas, en las células de los arcos branquiales (originadas a partir de las crestas neurales), en el endotelio de los vasos de los filamentos y los epitelios endo y ectodérmicos (Fig. 5a). En el estadio 23 y 24 la coloración fue intensa en las células ciliadas, en los epitelios branquiales y faríngeo, en el epitelio interno del opérculo y en el tubo neural; tambien se observó una reacción suave en el mesénquima y endotelios de los vasos sanguíneos (Fig. 5b). En el estadio I y II la inmunomarcación se encontró en los epitelios branquiales, las células ciliadas y en los mesotelios; la reacción fue negativa en el tejido conectivo y otras células de origen mesodérmico (Fig. 5c). La inmunocoloración en los estadio III a VIII se observó en los mismos tejidos pero con menor intensidad, siendo negativa en el conectivo, los músculos branquiales y el corazón (Fig. 5d).

KS Pan

Este anticuerpo identifica una serie de citoqueratinas básicas, del grupo 1 a 8 (Tabla 3). En el estadio 19 se encontró inmunorreacción positiva de gran intensidad en la epidermis de los esbozos branquiales y de menor intensidad en el endodermo. En el estadio 20-21 se observó coloración en el epitelio de los filamentos externos, la faringe y la epidermis, mientras que se detectó una reacción muy suave en corazón (Fig. 6a); el mismo patrón se encontró en el estadio 23, aunque la inmunomarcación resultó menos intensa en el epitelio faríngeo. En el estadio 24 se observó inmunorreacción tanto en los epitelios de origen ectodérmico de los filamentos externos como en el epitelio endodérmico de las branquias internas en desarrollo (Fig. 6b); tambien se encontró reacción en la epidermis,



faringe y corazón. En el estadio I los restos de los filamentos externos presentaron escasa coloración y se observó una inmunoreacción importante en los epitelios de las branquias internas, en el epitelio faríngeo y en corazón (Fig. 6c y d); la reacción fue negativa en los músculos branquiales. En el estadio II y V se observó el mismo patrón y se encontró también reacción en el endotelio de los vasos sanguíneos. En el estadio VIII se detectó inmunocoloración en los epitelios branquiales, en la epidermis, en la faringe y los endotelios (Fig. 6e), y con menor intensidad en corazón; además se encontró reacción suave en la envoltura de los músculos y cartílagos.

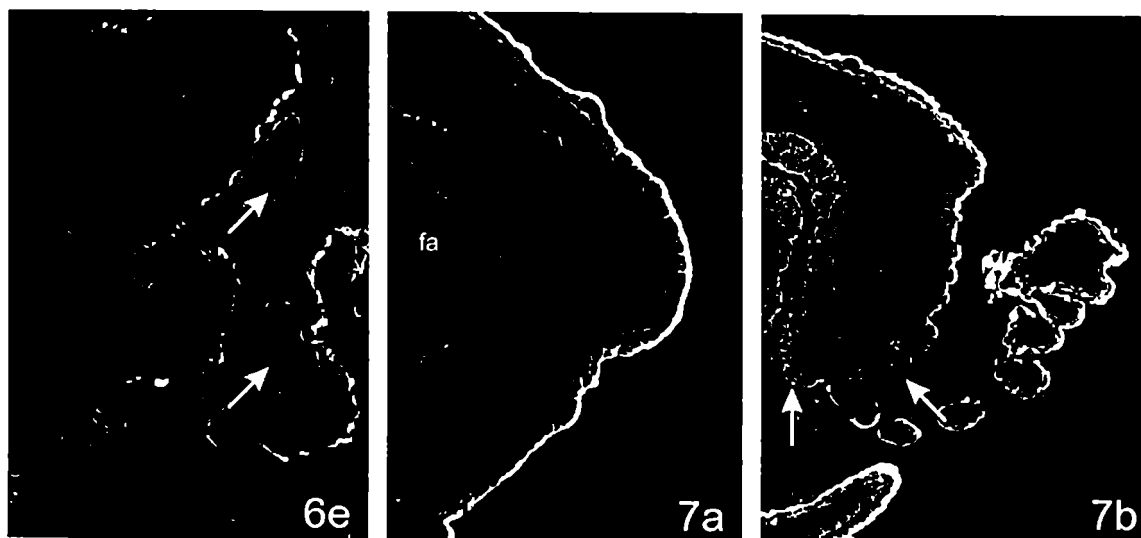
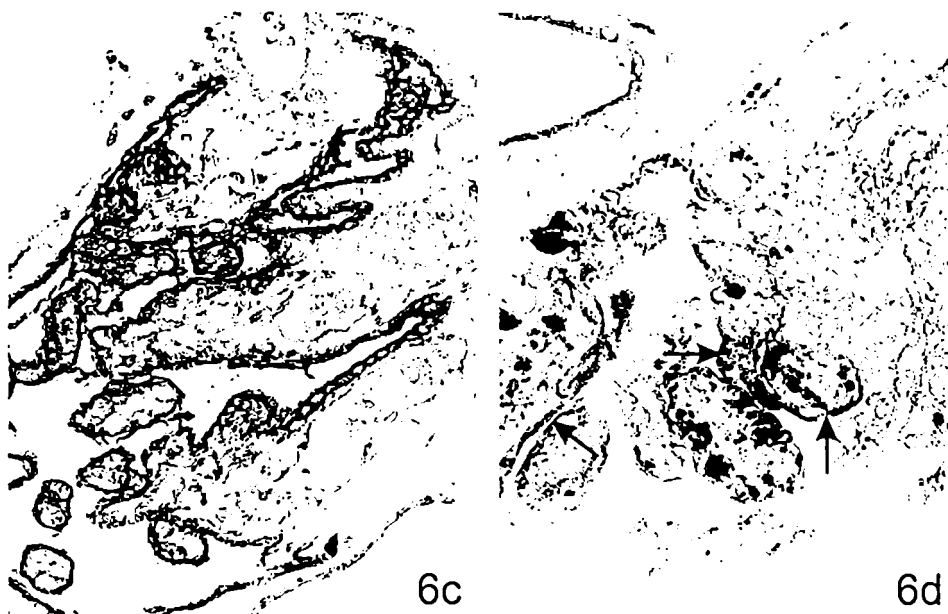
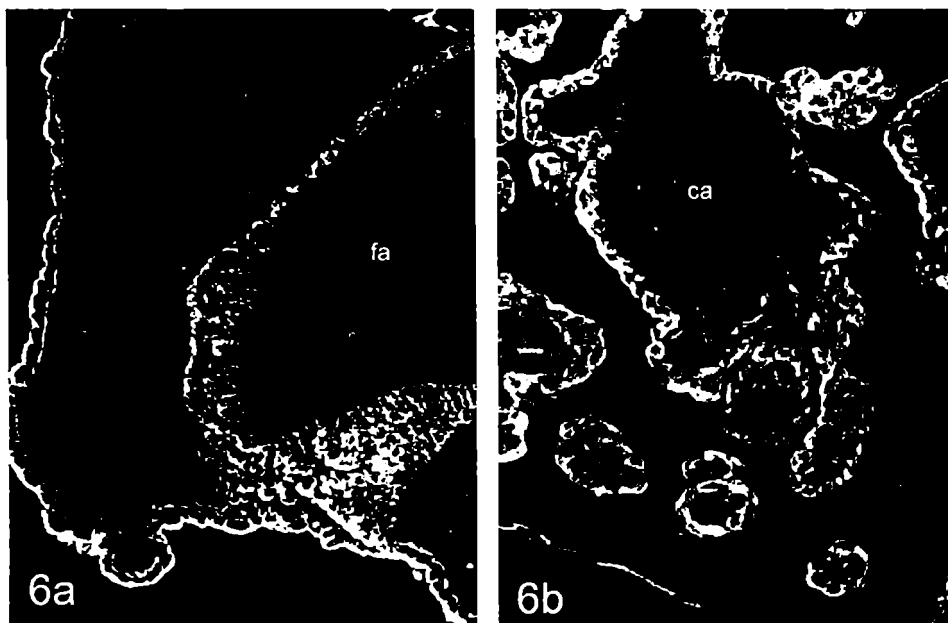
Citoqueratina 8.13

Este anticuerpo identifica diversas citoqueratinas tanto del grupo I como del II (Tabla 3).

En el estadio 19 la inmunorreacción resultó intensa en los epitelios de origen ectodérmico, como la epidermis de los esbozos branquiales, y fue de menor intensidad en los epitelios de origen endodérmico (Fig. 7a). El mismo tipo de reacción se encontró en los estadios 20 y 23, aunque se detectó expresión en todos los epitelios, la reacción fue mayor en los ectodérmicos (Fig. 7b). A partir del estadio 24 se observó inmunocoloración de la misma intensidad en los epitelios branquiales, mesotelios, epidermis y faringe, y se mantuvo el mismo patrón en los estadios subsiguientes analizados. La inmunorreacción resultó negativa en todos los estadios para los tejidos no epiteliales como conectivo, muscular, nervioso y corazón.

Citoqueratina 8

En el estadio 19 no se encontró inmunorreacción; en el estadio 20-21 se observó una coloración suave en los miótomos. En los estadios 23 y 24 se detectó expresión en los epitelios branquiales y faríngeo, y en corazón; la reacción fue



negativa en la epidermis (Fig. 8). En los estadios I y subsiguientes se observó el mismo patrón, una inmunocoloración suave en los epitelios branquiales, en la faringe y el corazón, y ausencia de expresión en otros epitelios y el endotelio de los capilares.

Citoqueratina 18

En el estadio 19 se observó reacción positiva en la epidermis de los esbozos branquiales, mientras que en el siguiente estadio se encontró inmunocoloración en el epitelio branquial y el faríngeo (Fig. 9a y b). A partir del estadio 23 se detectó expresión en los epitelios branquiales de origen ecto y endodérmico, en la faringe y en el opérculo; en el estadio 24 también se encontró una coloración suave en el corazón (Fig. 9c). La reacción fue negativa en otros epitelios y en el endotelio de los vasos. En el estadio I continuó el mismo patrón de expresión y además se observó inmunorreacción en los mesotelios; en los restos de los filamentos externos la reacción es de menor intensidad que en los demás epitelios branquiales. La reacción resultó negativa en otros epitelios y músculos. En el estadio II se encontró inmunocoloración en los epitelios branquiales de los filtros y crestas, en los mesotelios que bordean la cavidad branquial y en el epitelio faríngeo; la reacción fue negativa en otros epitelios, en músculos y corazón. En los estadios V y VIII la coloración continuó siendo intensa en los filtros (Fig. 9d), pero escasa y suave en las crestas; en ambos estadios se observó coloración en los mesotelios, en las células de los velos y en la faringe. En el estadio VIII además se detectó expresión en el corazón y algunas células endoteliales; también se encontró inmunorreacción en otros epitelios.

Citoqueratina 7

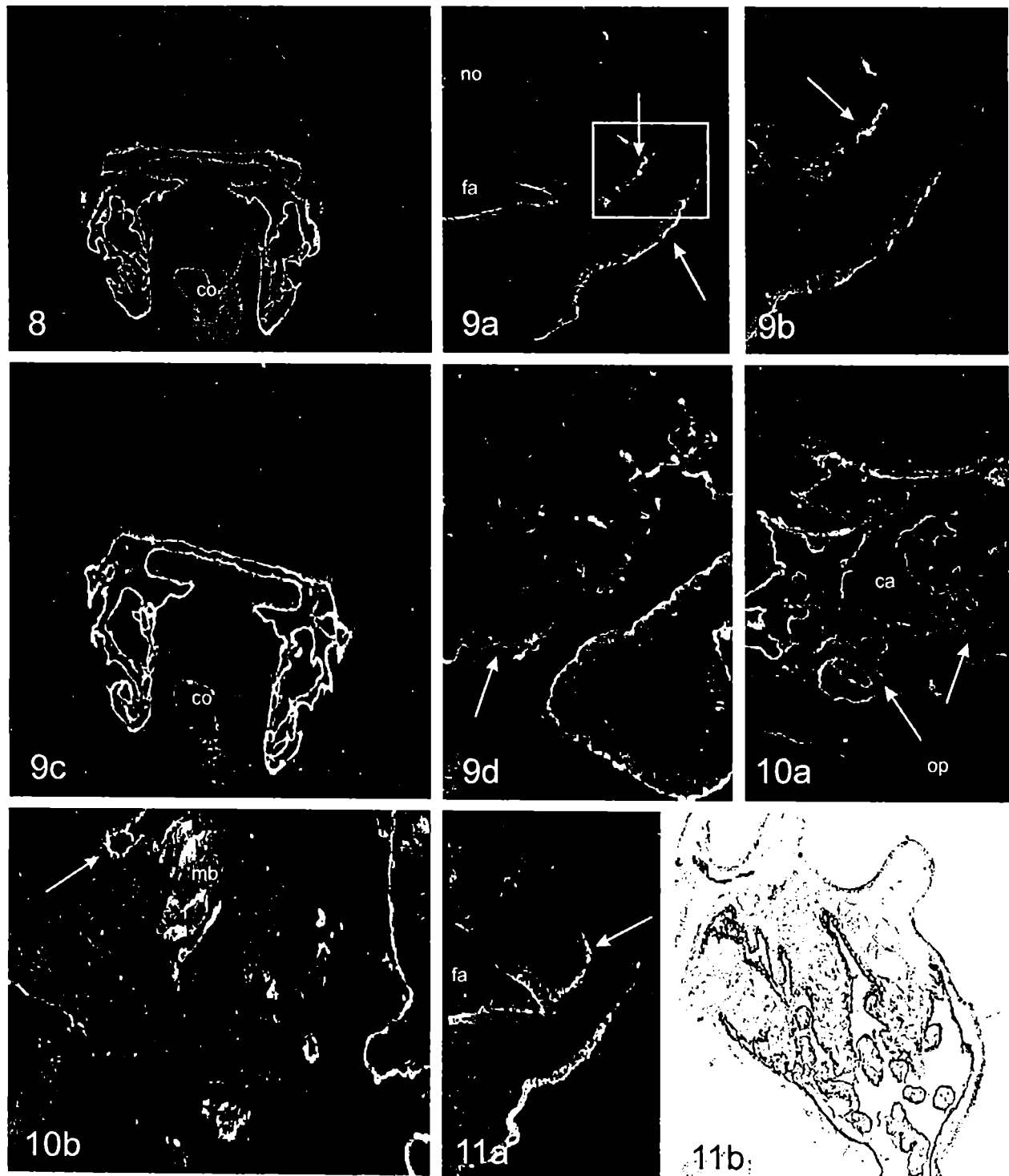
En el estadio 19 se encontró inmunorreacción positiva en la epidermis de los esbozos branquiales; en el siguiente estadio la inmunocoloración se observó en los

epitelios branquiales y la faringe. En los estadios 23 y 24 se detectó expresión para este péptido en los epitelios branquiales, el opérculo, la faringe y muy suave en corazón; la reacción resultó negativa en otros epitelios y en el endotelio de los capilares. A partir del estadio I también se encontró coloración en los mesotelios y no se observó en corazón. En los estadios II y V se detectó inmunorreacción en los epitelios de los filtros, de los velos y mesotelios; la expresión fue suave y escasa en los filamentos respiratorios y en la faringe (Fig. 10a). En el estadio VIII se repitió este patrón, y nuevamente se observó inmunofluorescencia en el corazón; además se encontró reacción positiva en los músculos branquiales (Fig. 10b).

Citoqueratina 4.62

Este anticuerpo reconoce específicamente el péptido 19.

En el estadio 19 la inmunocoloración fue observada en la epidermis de los esbozos branquiales, mientras que en el siguiente estadio (20-21) se encontró en el epitelio branquial y en la faringe (Fig. 11a). En los estadios 23 y 24 se detectó su expresión en el epitelio branquial endodérmico (que origina las branquias internas), el opérculo y la faringe; la reacción fue negativa en la epidermis de los filamentos externos, en los músculos, corazón y endotelios. En el estadio I la coloración se presentó en los epitelios branquial y faríngeo, en los mesotelios y el corazón (Fig. 11b), mientras que en el estadio II aunque se repitió este patrón, ya no se detectó en el corazón. En los estadios V y VIII la inmunomarcación fue observada como una coloración pericelular bien definida e intensa. en el epitelio de los filtros, los mesotelios y velos; en las crestas la reacción fue suave, mientras que fue negativa en músculos y epidermis. No se detectó expresión en otros epitelios, en músculos y endotelios.



Citoqueratina 14

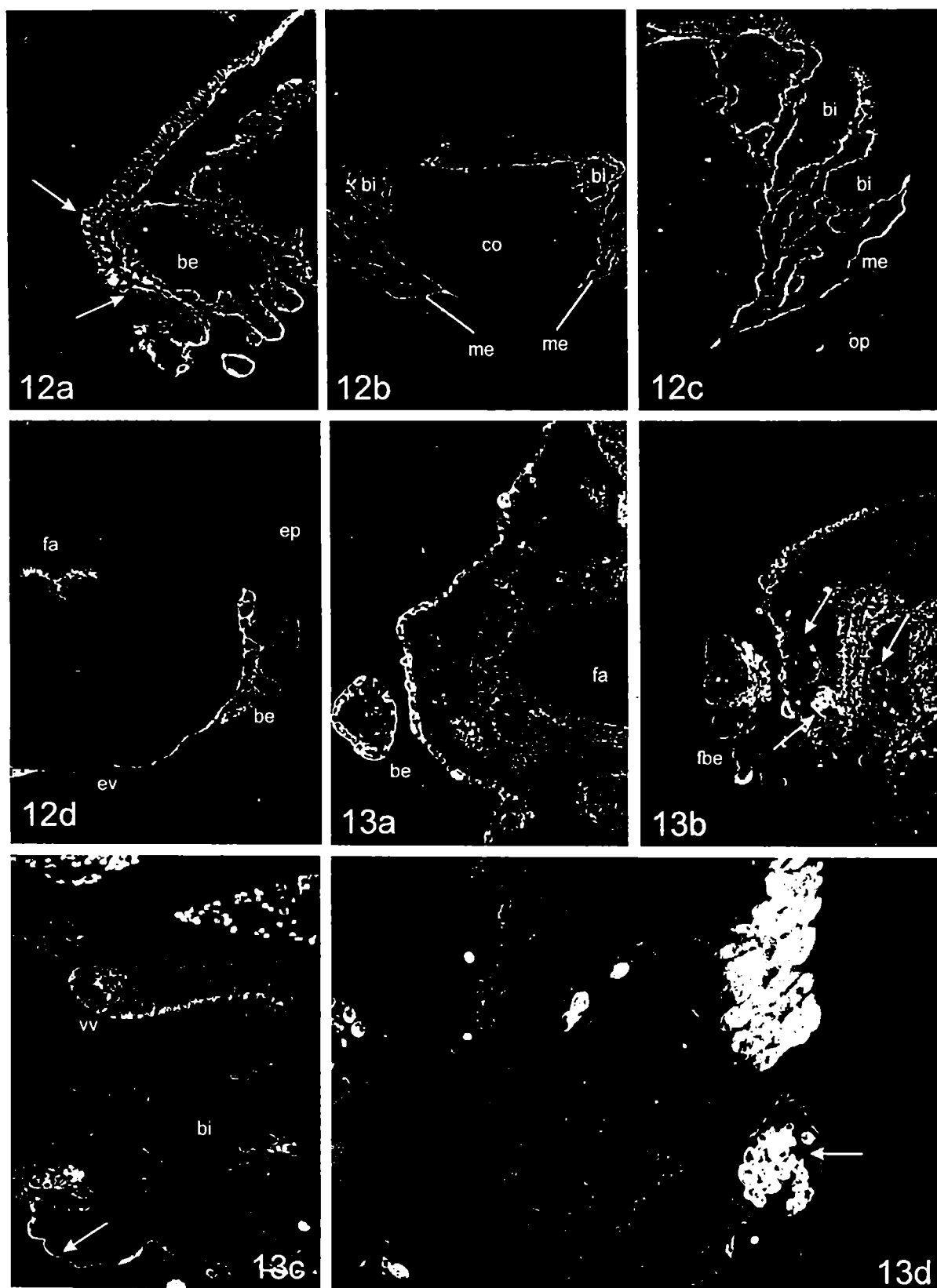
En el estadio 19 se encontró una reacción tenue en la epidermis de los esbozos branquiales, mientras que se observó una coloración definida en miótomos, células ciliadas y escasa marcación en corazón; en el estadio 20-21 se detectó inmunocoloración en el epitelio de los filamentos externos, en la faringe y las células de las membranas de contacto entre los surcos y las bolsas faríngeas. En los estadios 23 y 24 la inmunomarcación se observó en el epitelio branquial endodérmico, la faringe, el epitelio interno del opérculo y el mesotelio que rodea la cavidad branquial, en los miótomos y muy suave en corazón (Fig. 12). En el estadio I se mantuvo la expresión en los epitelios branquiales y mesotelios, además se observó en los músculos branquiales y en corazón; prácticamente no se encontró coloración en los restos de los filamentos externos. La reacción fue negativa en otros epitelios y en endotelios. El mismo patrón de expresión se observó en los estadios II y V; en el estadio VIII la inmunomarcación se repite en el epitelio de los filtros branquiales, en los mesotelios, los músculos branquiales, en el endotelio de los vasos, en faringe y corazón. En las crestas respiratorias la coloración observada fue débil y escasa.

Citoqueratinas 4 y 13

La reacción fue negativa en todos los estadios estudiados.

Vimentina

En el estadio 19 se observó una inmunocoloración definida y suave en la epidermis y las células de los miótomos, mientras que en los otros tipos celulares se encontró una marcación difusa y débil. En el estadio 20, la inmunorreacción se encontró definida en todos los tipos celulares, siendo la mas intensa la de epidermis y células musculares (Fig. 13a). En el estadio 23 se observó coloración en el epitelio de los filamentos branquiales, aunque de menor intensidad que el de las



células musculares; también se detectó inmunomarcación en el opérculo, en la epidermis y la faringe, y una reacción suave en el corazón y el endotelio de los vasos (Fig. 13b). En el estadio 24 se observó el mismo patrón de expresión y además se encontró una fuerte inmunomarcación en corazón; en el estadio I continuó la distribución amplia de la inmunorreacción, que incluyó también los músculos branquiales, el tejido conectivo y los eritrocitos. En el estadio II además se observó coloración en los mesotelios de la cavidad branquial (Fig. 13c); en el estadio V se detectó la mayor intensidad de reacción en corazón y en los envoltorios de los paquetes musculares; la inmunomarca permaneció igual en epitelios, en músculos branquiales y en los endotelios de los vasos de los filamentos respiratorios. En el estadio VIII la reacción fue más suave en el epitelio de los filtros branquiales, mientras que se observó el mismo patrón de coloración anterior en los restantes tejidos (Fig. 13d). En este estadio también se detectó expresión en el citoplasma de las células cilíndricas de los velos.

DISCUSION

El citoesqueleto celular está constituido por diferentes polipéptidos proteicos, organizados en filamentos, haces, retículos y túbulos; todavía existen muchas incógnitas sobre la existencia de estos elementos y sus interacciones en los tejidos de los vertebrados inferiores. La distribución de estos elementos del citoesqueleto en las células y tejidos debería ser evaluada en el contexto de su función, en correlación con los procesos del desarrollo y la diferenciación de tipos celulares especializados (Kasper *et al*, 1993). En nuestro caso hemos estudiado la presencia de diversas proteínas del citoesqueleto durante la histogénesis de los tejidos branquiales, desde su incipiente aparición en estadios embrionarios hasta su distribución en las células diferenciadas en estadios premetamórficos.

El presente trabajo demuestra la expresión y distribución de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios durante la morfogénesis de las branquias de *B. arenarum*. Este es el primer estudio realizado acerca del patrón de expresión de estas proteínas durante el desarrollo de las branquias externas e internas de anuros.

Si bien han sido utilizados anticuerpos elaborados a partir de antígenos de mamíferos, en trabajos anteriores se ha demostrado que existe “cross-reactivity” entre estos anticuerpos y las proteínas del citoesqueleto de distintos grupos de vertebrados, y que gran parte de estos polipéptidos han sido conservadas en la evolución (Ainis *et al*, 1995;Barrett *et al*, 1998). Además, otros trabajos han revelado que algunos de los anticuerpos utilizados en este estudio reaccionan con citoqueratinas homólogas de salamandras (anfibios urodelos) y *X. laevis* (Ferretti *et al*, 1993).

Estudios previos han establecido que la diversidad de citoqueratinas es mas amplia en algunos vertebrados inferiores que en los mamíferos, y que el patrón de expresión en tejidos de ciertas citoqueratinas se ha restringido a través de la evolución de los vertebrados (Markl y Franke, 1988). El análisis de una gran variedad de epitelios de otras especies ha dado como resultado el concepto de que existen ciertos “pares de citoqueratinas” en determinadas condiciones de diferenciación (Sun *et al*, 1984). Ck 8 y 18 constituyen uno de los pares, cuya expresión se encuentra en epitelios simples. En *Onchorhynchus mykiss* (trucha arco iris), las citoqueratinas del grupo L1-L3, relacionadas con las 8 y 18 de mamíferos, se presentan juntas en varios tejidos como hígado y riñon (Markl y Franke, 1988). Otro par encontrado en epitelios simples y en algunos estratificados es el compuesto por Ck 7 y Ck 17; por otra parte, la Ck 19 que se expresa en casi todos los epitelios, a excepción de la epidermis, no presenta una pareja de la subfamilia II (Nagle, 1994).

En el presente trabajo hemos observado que las citoqueratinas 8 y 18 presentan un patrón de expresión común, con una distribución similar tanto en los

filamentos branquiales externos como en las branquias internas; la citoqueratina 7 también mostró un patrón similar en líneas generales al de las citoqueratinas anteriores, si bien la intensidad de coloración siempre era menor a las anteriores. Lamentablemente no hemos podido contar con anticuerpos contra citoqueratina 17, por lo que no es posible confirmar si el par 7-17 se expresa en forma conjunta en los epitelios de *B. arenarum*. En cuanto a la citoqueratina 19, mostró un patrón de expresión similar a las ck 7, 8 y 18 especialmente en los primeros estadios; en los estadios larvales se mantuvo en los epitelios branquiales de manera restringida.

Las citoqueratinas más pequeñas (8, 18 y 19), características de los epitelios simples en vertebrados y que parecen constituir los tipos más primitivos dentro de esta familia proteica, son las primeras en expresarse durante la embriogénesis. (Lane y Alexander, 1990). Esta hipótesis se ve corroborada en parte con el análisis de nuestros resultados. En el presente estudio se observó la expresión de las citoqueratinas 8, 18 y 19 en los epitelios de origen ecto y endodérmico, desde el estadio 19 hasta el 23; a partir de este estadio solo se encontró la expresión de las citoqueratinas mencionadas en los epitelios de origen endodérmico, como los de las branquias internas y la faringe. Si bien la morfogénesis involucra numerosos cambios en la composición celular y la organización de los filamentos intermedios, la expresión de estas citoqueratinas fue permanente en las branquias en todos los estadios estudiados.

La presencia de las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 ha sido demostrada en distintos epitelios respiratorios, como los de las branquias de peces teleosteos (Markl y Franke, 1988; Ainis *et al*, 1995) y los epitelios pulmonares de humanos (Broers *et al*, 1989) y ratas (Kasper *et al*, 1993), mostrando un complejo patrón de expresión y permitiendo distinguir distintos tipos celulares, especialmente en los alveolos de mamíferos. En el caso de la trucha arco iris, el estudio inmunocitoquímico de citoqueratinas en todo el organismo demostró que el patrón de distribución más complejo es el observado en el epitelio branquial (Markl y Franke, 1988). A pesar de no conocerse claramente su función, en los epitelios pulmonares de mamíferos se

han observado cambios característicos de expresión de las citoqueratinas durante la embriogénesis (Kasper *et al*, 1993). Si bien nuestros resultados son coincidentes en cuanto a la presencia de las citoqueratinas 7,8,18 y 19 en los epitelios respiratorios embrionarios de *B. arenarum*, hemos comprobado que las mismas se expresan, si bien con ligeras variaciones, durante todo el proceso de diferenciación branquial.

En todos los estadios estudiados se observó la presencia preponderante de citoqueratinas en los epitelios y otros tejidos, a través de las inmunocoloraciones obtenidas con los anticuerpos KS pan y ck 8.13. A partir del estadio 23 se observa que los epitelios de origen ectodérmico dejan de expresar citoqueratinas chicas (7, 8, 18, 19), las que solo se encuentran en los epitelios de origen endodérmico; por lo tanto, las inmunorreacciones observadas con estos anticuerpos en epitelios ectodérmicos de estadios avanzados se deberían a la presencia de otras citoqueratinas ácidas, características de epitelios queratinizados (como la 1, 6, 10 y 11)

En el presente trabajo se ha demostrado la distribución de citoqueratinas en los epitelios branquiales, con mayor intensidad de expresión en los filtros que en los filamentos respiratorios, a pesar de que en ambas estructuras se encuentran los mismos tipos celulares (ver Capítulo 5). Esta diferencia de citoesqueleto estaría relacionada con la participación de los primeros en la filtración de partículas, mientras que en las crestas el epitelio se reduce a una simple cobertura de los vasos sanguíneos que intervienen en el intercambio gaseoso. También resultó importante la presencia de citoqueratinas en los velos, considerados parte del aparato filtrante. La función de los Fls es todavía en gran parte desconocida, aunque debido a su relativa insolubilidad y su disposición en las células musculares, se ha presumido durante mucho tiempo que el principal rol sería el soporte mecánico de las células (Cary y Klymkowsky, 1995); las citoqueratinas constituyen el grupo mas probable, entre todas las proteínas citoesqueletales, de ser las responsables en las funciones de soporte (Lane y Alexander, 1990). En las células

epiteliales los filamentos de citoqueratinas llegan a constituir entre el 30 y 60% del contenido proteico total del citoplasma. Se ha demostrado que son capaces de interactuar con la membrana nuclear (Nagle 1994), mientras que, según el tipo de tejido, tanto las citoqueratinas como la vimentina y la desmina, están asociados con los desmosomas de la membrana plasmática (Schäffer *et al*, 1993; Kouklis *et al*, 1994), participando por lo tanto en la cohesión intercelular.

La localización periférica de citoqueratinas en algunos tipos celulares es muy inusual en el caso de células epiteliales, por lo que debiera ser estudiado desde un punto de vista funcional tomando en cuenta la probable colocalización de estos filamentos con algunas organelas citoplasmáticas (Kasper *et al*, 1993).

En células en cultivo, uno de los reguladores de los filamentos intermedios de las células mesoteliales parece estar asociado con la actividad proliferativa (Connell y Rheinwald, 1983); se ha sugerido que la presencia de vimentina en epitelios tempranos puede estar relacionado con las fases proliferativas de estas células (Fröjdman *et al*, 1993). Por otra parte, ha sido descrito la coexpresión de vimentina y citoqueratinas en los epitelios respiratorios de fetos humanos y de roedores adultos (Kasper, 1989; Broers *et al*, 1989). En *Onchorrhynchus mykiss* ha sido descrita la presencia de las citoqueratinas L1, L2 y L3 en algunos tejidos branquiales que no son considerados epitelios típicos, como el endotelio de los vasos (Markl y Franke, 1988), el cual en vertebrados superiores, expresa primariamente vimentina.

En nuestro estudio una relación similar ha sido observada para vimentina, ya que su expresión es mas evidente en células que muestran activa proliferación (ver Capítulo 2); además la coexpresión de vimentina y citoqueratinas es evidente a nivel de los epitelios branquiales, principalmente en etapas tempranas del desarrollo.

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos en las branquias mostraron inmunorreactividad con anti-vimentina y algunas citoqueratinas. También se ha encontrado en las células endoteliales de otros anfibios, peces y mamíferos expresión de citoqueratinas (Jahn *et al*, 1987; Markl y Franke, 1988; Arena *et al*,

1995) así como de vimentina (Dikranian *et al*, 1993). Por otra parte, las células de los músculos branquiales fueron inmunocoloreadas por algunas anti-citoqueratinas, coincidiendo con los reportes de expresión de pequeñas cantidades de estas proteínas en diversos tipos de células musculares de otros anfibios (Jahn *et al*, 1987), de embriones de pollo (Kuruc y Franke, 1988) y de fetos humanos (Goron *et al*, 1988), lo que sugeriría su importancia durante los procesos de diferenciación muscular.

Como parte del aparato filtrante, los velos y los filtros branquiales presentan células secretorias; la función de los microtúbulos en la zona apical de las células secretorias sería la de guiar y transportar vacuolas durante la extrusión de la secreción (Viertel y Richter, 2000); se ha encontrado síntesis de mucus en el velo ventral de larvas de *X. laevis* desde el estadio 45 (Nieuwkoop Faber). En *B. arenarum* si bien no hemos realizado un análisis de la síntesis y secreción de mucus, se conoce que las secreciones mucosas son abundantes a nivel branquial, en donde cumplen funciones de lubricación y retención de partículas. Coincidentemente la mayor intensidad de inmunomarcación de tubulinas se verifica en las células ciliadas y epiteliales en estadios 24 y I.

En el caso de las citoqueratinas 4 y 13, las cuales se encuentran en epitelios escamosos estratificados o pseudoestratificados pero no queratinizados de mamíferos, el resultado de la inmunomarcación resultó negativa en todos los estadios estudiados; en cambio se detectó expresión de citoqueratina 14, presente usualmente en mioepitelios y las capas basales de epitelios escamosos. La inmunocoloración se observó principalmente en los epitelios de origen endodérmico como el de los filamentos branquiales, los mesotelios y la capa interna del opérculo, y en células musculares, un patrón similar al mostrado por las citoqueratinas 8, 18 y 19.

Algunos estudios recientes realizados en células basales de la epidermis, han mostrado que la citoqueratina 14 se encuentra asociada con los hemidesmosomas e involucrada en la unión estroma-célula; mutaciones introducidas en la

citoqueratina 14 en ratones transgénicos, provocan una pérdida de la integridad en la conexión epidermis-dermis (Vassar *et al*, 1991) mientras que mutaciones similares pero en humanos indican que la polimerización correcta de esta citoqueratina es necesaria para la función normal de los hemidesmosomas (Coulombe *et al*, 1991). La falta de filamentos citoqueratínicos en hepatocitos debido a la exposición a metales pesados, ha resultado en la incapacidad de secreción y captación de proteínas por estas células (Kawahara *et al*, 1990)

En conclusión nuestro análisis inmunocitoquímico de proteínas citoesqueletales durante la diferenciación branquial ha puesto en evidencia un complejo patrón de expresión que, en líneas generales, caracteriza e identifica distintos tipos celulares. La función precisa de cada uno de estos filamentos, aparte de su participación en el sosten celular, no es conocida y nuevos estudios experimentales serán necesarios para resolver este enigma.

Capítulo 4

PROCESOS INDUCTIVOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS

INTRODUCCION

El desarrollo de células especializadas a través del mecanismo de diferenciación es precedido de un proceso por el cual una célula o un grupo celular es comprometido a un destino particular. Históricamente los embriólogos han utilizado el término *determinación* para denominar este evento; sin embargo, un tejido puede ser clasificado como determinado o indeterminado de acuerdo al ensayo experimental utilizado (Harrison, 1933). Slack (1991) dividió este proceso en dos fases o estadios, *especificación* y *determinación*; una célula o tejido se encuentra *especificado* cuando es capaz de diferenciar en forma autónoma en un medio neutro, por ej. mediante el cultivo celular u organotípico llevado a cabo *in vitro*. En cambio, una célula o tejido se encuentra *determinado* cuando es capaz de diferenciar autonomamente, ubicado en una región distinta del embrión a la que naturalmente desarrollaría (sitio ectópico), por ej. mediante un trasplante.

Si un grupo celular es capaz de diferenciar de acuerdo a su destino original en esas condiciones, se presume que la *determinación* es irreversible. Por otra parte, el trasplante de esbozos durante la embriogénesis ha permitido estudiar no solo el desarrollo de los mismos en lugares ectópicos, sino la posibilidad de migración de células del trasplante y su integración a otros tejidos del huésped (Koo y Graziadei, 1995). Para el estudio de estos eventos durante el desarrollo se han utilizado trasplantes de tipo *homoplásticos* (en individuos de la misma especie) y *heteroplásticos* (entre individuos de distintas especies).

Existen tres mecanismos principales para alcanzar el destino reservado a una célula o un grupo celular (Davidson, 1991):

- 1- la *especificación autónoma*, en que las células son especificadas de acuerdo a sus propios componentes citoplasmáticos;

- 2- la *especificación condicional*, la mas usual entre los vertebrados, donde las células presentan la capacidad de regular su desarrollo, dependiendo de las interacciones con sus vecinas y las posiciones relativas de los grupos celulares.
- 3- la *especificación sincicial*, que se observa en numerosos insectos y depende de la interacción de componentes maternos en el blastodermo sincicial, previo a la separación de los núcleos.

Los órganos son estructuras complejas compuestas por numerosos tipos de tejidos; la construcción de los mismos depende de la interacción de grupos de células adyacentes. El proceso por el cual una región embrionaria interactúa con otra región, provocando su diferenciación o un particular comportamiento, es denominado *inducción*. Existen diversos procesos inductivos durante el desarrollo embrionario: clasicamente se denomina *inducción primaria* embrionaria a la producida por el labio dorsal del blastoporo en la formación del eje dorsal y del tubo neural. Sin embargo este no es el primer evento de inducción que se verifica en el embrión; la diferenciación del mesodermo en etapas blastulares, por una acción inductora del endodermo sobre células ectodérmicas, antecede a la inducción del labio dorsal del blastoporo.

La *inducción secundaria* es la interacción que se observa en la formación de cualquier órgano, cuando un grupo celular es capaz de responder con algun cambio a la influencia de otro cercano, y a su vez, es capaz de alterar el comportamiento de un tercer grupo celular. Algunos de los casos mejor estudiados de inducción secundaria son aquellos que involucran la interacción de células epiteliales con células mesenquimáticas durante el desarrollo de numerosos órganos.

Holtzer (1968) distinguió dos tipos de inducciones secundarias o interacciones proximales: la *interacción instructiva*, en la que necesario que se produzca una señal desde la célula o tejido inductor que inicie una expresión génica nueva en la célula o tejido inducido. Sin esta señal, la segunda célula o tejido es incapaz de diferenciar normalmente o lo hace de una manera distinta a la original. La otra clase de inducción secundaria es la *interacción permisiva*, en que una célula o tejido

contiene todo el potencial para expresarse y solo necesita un ambiente adecuado para llevarlo a cabo, el cual no altera el tipo celular que desarrollara.

Un concepto también importante en el estudio de la diferenciación celular embrionaria es el de *competencia*, que es la capacidad de un tejido de responder a una señal inductiva (Waddington, 1940). Esta es una habilidad adquirida activamente por el grupo celular, y que puede variar en diversos estadios.

El desarrollo de las branquias de los anfibios comenzó a ser estudiado desde un punto de vista morfológico durante el siglo XIX, sin embargo recién a principios del siglo pasado algunos embriólogos experimentales encontraron que las branquias podían ser útiles en el estudio de las interacciones entre las tres hojas embrionarias y los procesos inductivos durante el desarrollo (Ekman, 1913; Harrison, 1921; Severinghaus, 1930; Moser, 1940). Para ello, realizaron series de explantes y trasplantes de los esbozos branquiales en distintas especies de anuros y urodelos, con el objeto de analizar el estado de especificación, determinación y competencia de los mencionados esbozos embrionarios.

Si bien las branquias externas están constituidas básicamente por filamentos recubiertos con una epidermis de origen ectodérmico, tanto en anuros como en urodelos, la presencia de los tejidos embrionarios internos (endodermo y mesodermo) son fundamentales en el desarrollo de los mismos (interacción instructiva). Se ha demostrado en el axolote *Ambystoma punctatum* (Urodela) a través de trasplantes ectópicos de porciones del esbozo branquial, que el desarrollo de las branquias externas no depende del ectodermo, sino de las capas subyacentes a ese epitelio, el mesodermo y endodermo (especificación condicional) (Harrison, 1921). También ha sido demostrado en urodelos a través de trasplantes, que el endodermo determina la posición de las branquias, ya que su rotación altera la orientación de las mismas (Severinghaus, 1930); por otra parte, si el endodermo es extraído del esbozo y permanece el ectodermo presuntivo cubriendo la zona explantada, las branquias externas no se desarrollan (Mangold, 1936). Además, el ectodermo presuntivo branquial, solo o incluyendo mesodermo,

no promueve la diferenciación de filamentos branquiales cuando es transplantado ectópicamente (Harrison, 1921; Severinghaus, 1930; Moser, 1940), mientras que el trasplante de endodermo promueve el desarrollo de filamentos supranumerarios (Ichikawa, 1934, 1938).

Los estudios realizados en anuros no siempre han confirmado las observaciones efectuadas en urodelos; Ekman (1913) destacó la importancia del ectodermo presuntivo para el desarrollo de las branquias externas, basado en los resultados de numerosos experimentos de trasplantes ectópicos homo y heteroplásticos del mencionado epitelio en embriones de *Bombinator* y *Rana*. Estos trasplantes fueron capaces de diferenciar filamentos branquiales aunque no estuviera presente el meso y endodermo del esbozo, mientras que si el ectodermo era rotado los filamentos se desarrollaban en el sentido que tuviera el ectodermo transplantado. Sin embargo, sus resultados fueron objetados por otros autores, que presentaron distintas observaciones con los mismos procedimientos; Schmidt (1937) logró inducir la formación de filamentos branquiales en ectodermo proveniente de gástrulas de varios anuros, cultivado con endo y mesodermo del esbozo branquial de *Triton*. Por otra parte, los trasplantes de esbozos branquiales completos (ecto, meso y endodermo) realizados en *Rana fusca* y *Discoglossus pictus*, diferenciaron en estructuras morfológicas e histológicas análogas a las encontradas en las branquias normales, pero cuando se transplantó sólo el ectodermo presuntivo branquial únicamente el 10 % de los trasplantes desarrolló filamentos análogos a los branquiales (Raunich, 1942).

OBJETIVOS

Dada la diferencia entre las distintas especies expuestas y frente a la falta de resultados en relación a los procesos de diferenciación branquial en *Bufo*

arenarum, hemos encarado un estudio experimental con el objetivo de conocer algunos de los eventos inductivos durante el desarrollo de las branquias. Para ello se efectuaron explantes del esbozo branquial, cultivos organotípicos y transplantes ectópicos, tratando de establecer la capacidad de diferenciación, el estado de determinación y especificación del esbozo a partir de su visualización en estadios embrionarios. Además de las técnicas experimentales se efectuó el análisis histológico de los explantes y embriones, que se complementó con el análisis de la expresión inmunocitoquímica de proteínas citoesqueléticas en los mismos, utilizadas como marcadores moleculares de diferenciación.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Obtención y Mantenimiento de Animales Adultos y Embriones

Ver Capítulo 1

METODOS EXPERIMENTALES

Explantes de esbozos branquiales

Los embriones en el estadio 17 (botón caudal, Del Conte y Sirlin, 1952), presentan los esbozos presuntivos branquiales a cada lado de la región cefálica (fig. 3). Los esbozos están compuestos por un epitelio ectodérmico, las bolsas faríngeas endodérmicas y el mesodermo intermedio, que ya ha sido invadido en este estadio por células de las crestas neurales para constituir los arcos branquiales

(ver Capítulo 1, fig. 11). Como no es posible separar el endo y mesodermo branquiales, para las operaciones se consideraron dos partes del esbozo: el ectodermo y el endo-mesodermo.

Los experimentos fueron realizados con embriones obtenidos a partir de tres ovulaciones distintas. Tanto las operaciones, como los cultivos y mantenimiento de los embriones se llevó a cabo en condiciones estériles.

Para realizar las operaciones, los embriones fueron previamente ubicados en cápsulas de Petri con solución estéril de Steinberg 10 % (NaCl 60 mM, KCl 0,67 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,34 mM, MgSO_4 0,83 mM, HEPES 10 mM), pH 7,4; luego fueron transferidos a cápsulas de parafina negra conteniendo solución estéril de Steinberg 100 %, donde se llevaron a cabo las operaciones.

Todo el trabajo de micromanipulación se realizó bajo lupa; en primer lugar, la membrana vitelina fué removida utilizando pinzas de relojero N° 5, enjuagadas previamente en etanol 70, pasadas por la llama de un mechero y lavadas en solución salina. Estas pinzas se utilizaron también para efectuar el resto de las operaciones, con la ayuda de agujas y ansas de Spemann y agujas de un pelo de ceja.

Con el objetivo de estudiar la capacidad de diferenciación del esbozo branquial *in vitro* se efectuó un diseño experimental que incluyó tres grupos de cultivos (fig. 1), según el tejido explantado:

A) ectodermo branquial presuntivo; se explantó el epitelio ectodérmico que cubre el explante con las pinzas y se limpió la capa interna de restos de células endo y mesodérmicas con las ansas y agujas.

B) endo-mesodermo (bolsas faríngeas y esbozos de arcos branquiales).

B1 - se realizó una incisión en la parte anterolateral del esbozo y se extrajo el tejido interno con un ansa, tratando de no dañar el ectodermo que permaneció cubriendo el área explantada.

B2 - se realizó el explante de la misma manera y se formó un "sandwich", para lo cual el tejido explantado fué envuelto con ectodermo banal proveniente de

áreas posteriores de néurulas (estadios 15 y 16), y se los mantuvo presionados por unos puentes de vidrio hasta que se pegaron los bordes del ectodermo.

C) el esbozo completo (ecto-endo-mesodermo)

En los tres casos los explantes se mantuvieron en cultivo entre 4 y 7 días en cápsulas de vidrio con solución estéril de Steimberg 10%, que era renovada diariamente, y de la misma manera se mantuvieron dos grupos de embriones como controles. Algunos de los cultivos fueron fijados cuando los controles alcanzaron el estadio 21, el resto al cumplirse una semana, en que los controles alcanzaron el estadio 25; la fijación y procesamiento del material se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos de Estudio (Microscopía óptica y Técnicas inmunocitoquímicas)

Embriones explantados

Para estudiar el desarrollo de embriones carentes de los esbozos branquiales, embriones en estadio 17 obtenidos a partir de tres ovulaciones distintas, fueron sometidos a los explantes detallados en el punto anterior (grupos A, B y C); en cada grupo, la mitad de los ejemplares fueron operados de un lado (derecho e izquierdo alternativamente) y la otra mitad de ambos lados .

Los embriones explantados y un grupo de controles fueron mantenidos en cápsulas de Petri con solución estéril de Steinberg 10 %. Parte de los embriones fueron fijados en estadio de branquias externas (22, Del Conte y Sirlin, 1952) y otros en el estadio I larval (Martín *et al*, 1985), según lo descrito en Métodos de Estudio (Microscopía óptica).

Microinyección de embriones y Transplantes

Para analizar el desarrollo del esbozo branquial transplantado en áreas embrionarias ectópicas, los embriones donadores del esbozo branquial fueron inyectados previamente a la operación con un colorante vital fluorescente, amino

dextrano fluorescinado (FDA, Molecular Probes, Eugene, OR), con el objetivo de reconocer el trasplante y su progenie celular en el embrión receptor.

En el estadio de una célula (entre estadios 2 y 3, Del Conte y Sirlin, 1952) los embriones elegidos para ser donantes del explante, fueron tratados 2-3' con ácido tioglicólico 1 % en solución de Holtfreter, pH 7, con el fin de remover la gelatina que los envuelve. A continuación fueron lavados con solución estéril de Steinberg 10 % y transferidos a cápsulas de parafina con solución de Ficoll 5 % en Steinberg 100 %, para evitar la pérdida de citoplasma durante el proceso de microinyección. Los embriones fueron inyectados con 50 nl de solución acuosa de 50mg/ml de FDA, con agujas de vidrio y un micromanipulador (Leitz). Estos embriones se mantuvieron en la solución concentrada de Steinberg durante una hora, y luego continuaron el desarrollo en solución estéril de Steinberg 10 %.

Al alcanzar el estadio 17, previamente a realizar los explantes, se controló en un microscopio de epifluorescencia Polyvar (Reichert-Jung) que los embriones a utilizar como donadores presentaran una coloración fluorescente uniforme.

Los explantes de los esbozos presuntivos fueron efectuados de la manera detallada anteriormente, también en solución de Steinberg 100%; se realizaron dos series de explantes y trasplantes ectópicos (fig. 2):

A) Trasplantes externos: se transplantó el *esbozo completo* en el área externa lateroventral del cuerpo o en la zona caudal de embriones en el mismo estadio del donador;

B) Trasplantes internos: se transplantó el *endo-mesodermo* del esbozo (bolsas faríngeas y esbozos de arcos viscerales), en el área ventral interna de embriones en estadios de néurula (15) y de botón caudal (17).

Pasada una hora del trasplante, los embriones se transfirieron a cápsulas de Petri con solución estéril de Steinberg 10%. Los embriones con trasplantes ectópicos se fijaron en estadio de branquias externas (22, Del Conte y Sirlin, 1952) y en los estadios I y II larval (Martín *et al*, 1985), según lo descrito en Métodos de Estudio (Microscopía óptica).

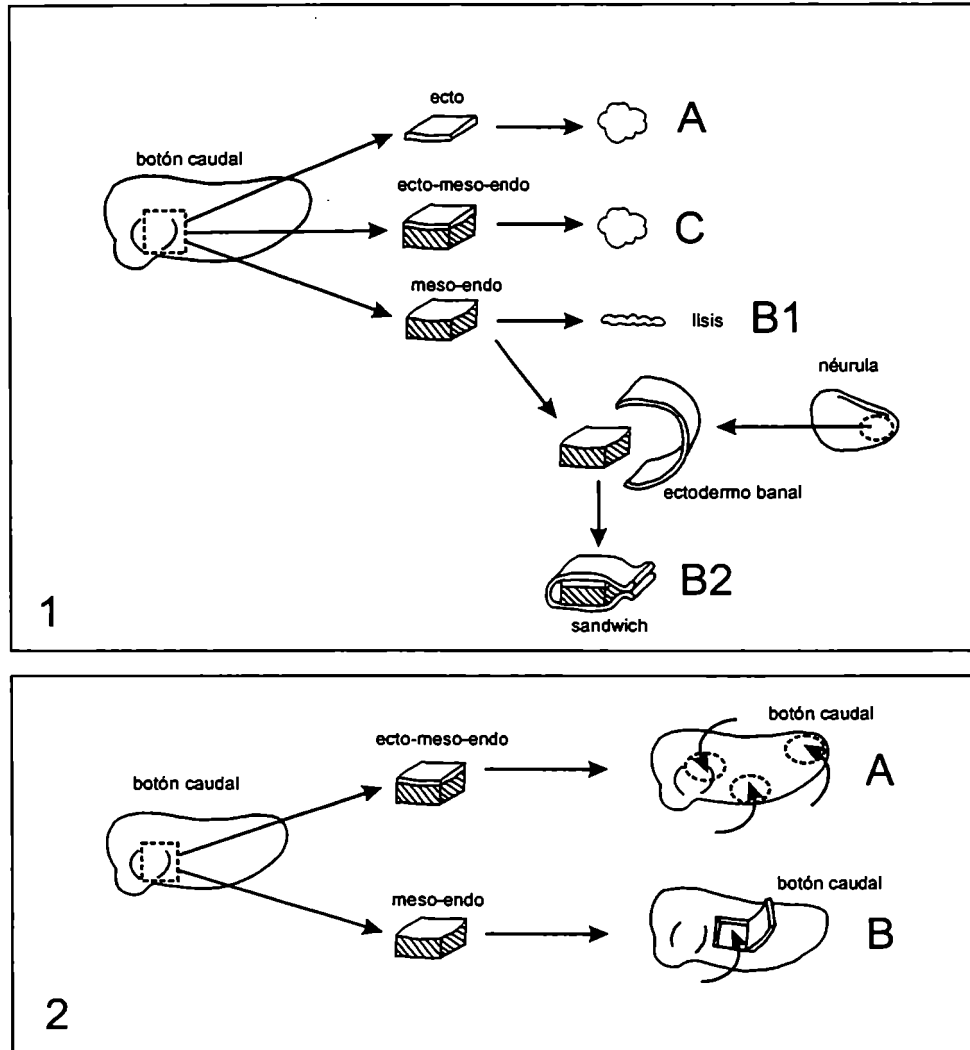


Figura 1: Representación gráfica del diseño experimental de los explantes efectuados de distintas partes del esbozo branquial y su posterior cultivo.

Figura 2: Representación gráfica de los explantes efectuados de distintas partes del esbozo branquial y su posterior transplante en embriones del mismo estadio.

METODOS DE ESTUDIO

Observaciones Macroscópicas

Las observaciones macroscópicas se llevaron a cabo con un microscopio estereoscópico Photomakroskop M 400 (Wild) y las fotomicrografías fueron tomadas con película TMax 400.

Microscopía Óptica y análisis histológico

Los embriones, larvas y explantes cultivados fueron fijados por inmersión en el líquido de Bouin y procesados según se detalla en el Capítulo 1.

Observación de Embriones Transplantados

Los embriones transplantados fueron fijados en solución de formaldehído 4% en buffer fosfato salino 0.1M durante 20h a 4°C, luego los ejemplares fueron lavados y conservados en alcohol 70° a 4°C. Para su observación en el microscopio, fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes, en una mezcla de alcohol absoluto y xilol, en xilol puro e incluídos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C). Se realizaron cortes seriados de 6µm en sentido transversal, los que fueron montados en portaobjetos tratados previamente con alcoholes y éter, con el objeto de permitir la adherencia de las muestras sin utilizar albúmina. Una vez secos, estos preparados fueron desparafinados en xilol, hidratados en una serie descendente de alcoholes, lavados en PBS y montados con un medio acuoso no permanente (0,3% propilenglicol, 30% glicerina, 0,3% azida sódica en buffer fosfato salino); las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio de epifluorescencia Polyvar (Reichert-Jung) y las fotografías fueron tomadas con película TMAX 400 (Kodak).

En algunos de estos preparados se aplicó posteriormente la técnica de inmunofluorescencia según se detalla mas adelante (ver Técnicas Inmunocitoquímicas en esta misma sección), para lo cual se realizaron previamente extensos lavados en buffer fosfato salino (PBS). Después de ser observados y fotografiados, nuevamente fueron lavados en PBS, agua destilada y coloreados según se detalla en el punto anterior (Análisis Histológico).

Técnicas Inmunocitoquímicas

Los embriones, larvas y explantes fueron fijados por inmersión en distintas soluciones de acuerdo con el anticuerpo a aplicar posteriormente en la inmunomarcación; los fijadores utilizados y el procedimiento se detallan a continuación:

- líquido de Bouin durante 3h (90' a 4°C y 90' a temperatura ambiente), luego los ejemplares fueron lavados y conservados en alcohol 70° a 4°C.
- líquido de Dent (20% de dimetil sulfóxido en metanol) durante 20h a 4°C, luego los ejemplares fueron conservados en metanol a 4°C.
- solución de formaldehído 4% en buffer fosfato salino 0.1M durante 20h a 4°C, luego los ejemplares fueron conservados en alcohol 70° a 4°C.

Para la detección de proteínas componentes de los microfilamentos y microtúbulos, se utilizó material fijado en Bouin, mientras que para los filamentos intermedios se aplicó el líquido de Dent. La solución de formaldehído fue utilizada en la fijación de los embriones transplantados, (Ver Microinyección y Transplantes de Embriones, en la sección Métodos Experimentales); para la inmunodetección de proteínas filamentosas en este material se aplicó previamente un tratamiento enzimático, detallado mas adelante. El detalle y la procedencia de los anticuerpos utilizados y las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas se encuentran en el Capítulo 3. Para la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia en los embriones transplantados, luego de la observación del tejido marcado con FDA (Ver

Observación de Embriones Transplantados, en esta misma sección), los portaobjetos fueron desmontados y lavados varias horas en PBS. Luego fueron inmersos en una solución 0,1% de Tripsina y 0,1% CaCl en buffer Tris salino (pH 7,8) en un coplin, el que se mantuvo en agitación constante durante 10'a 37°C en un baño termostático; el tratamiento enzimático permitió desenmascarar algunos antígenos, inaccesibles a la inmunomarcación por la fijación con formaldehído. La reacción fue detenida con varios lavados de buffer Tris-salino a 20°C; luego los portaobjetos fueron lavados en PBS a temperatura ambiente y se continuó con el procedimiento normal de inmunofluorescencia. Como el marcador de progenie celular estaba conjugado con fluoresceína, para las inmunorreacciones se utilizaron los anticuerpos secundarios conjugados con tetramethylrodamine (TRITC).

RESULTADOS

Explantos Cultivados

Con el objeto de establecer el grado de especificación del esbozo branquial en el estadio de botón caudal, se llevaron a cabo una serie de explantes de distintas porciones del mismo y se los mantuvo en cultivo durante una semana (Tablas 1 y 2).

GRUPO	TIPO EXPLANTE	Nº CULTIVOS	SOBREVIV	ST 20	ST 25
A	Ectodermo	30	22	10	12
B1	endo-mesodermo	30	0	0	0
B2	sandwich endo-mesodermo	34	31	12	19
C	Esbozo completo	32	28	12	16

Tabla 1: Números de explantes cultivados, de sobrevivientes y de fijados en los estadios 20 y 25.

GRUPO	TIPO EXPLANTE	Nº CULTIVOS	ECTOD	ENDOD	MESEN	MUSC	CART	CAPIL
A	ectodermo	22	22	0	0	0	0	0
B2	sandwich endo-mesodermo	31	31	31	31	11	12	15
C	esbozo completo	28	28	28	28	15	16	25

Tabla 2: Diferenciación de tipos celulares en los explantes cultivados. ECTOD: ectodermo; ENDOD: endodermo; MESEN: mesénquima; MUSC: músculo; CART: cartílago; CAPIL: capilares.

A) de epitelio ectodérmico branquial presuntivo.

Los explantes cultivados de este grupo formaron una masa de células compactas, con un aspecto de vesículas irregulares, sin desarrollar ningún tipo de estructuras filamentosas análogas a las observadas en las branquias (fig. 4). El análisis histológico de estos explantes demostró un epitelio externo muy pigmentado y con células ciliadas; internamente a ese epitelio se diferenció un grupo de células mas claras e incluso algunas pequeñas cavidades donde se encontraron algunos restos celulares (fig. 5). También se observaron algunos núcleos picnóticos y escasas plaquetas vitelinas.

B) de endo-mesodermo (bolsas faríngeas y esbozos de arcos viscerales)

B1- En los explantes de este grupo mantenidos en cultivo, se observó lisis celular a las 24h.

B2- Los cultivos en "sandwich" no desarrollaron filamentos visibles externamente (fig. 6); sin embargo, el análisis histológico efectuado una semana después mostró una diferenciación clara de grupos de células endodérmicas, cartilago, capilares, y mesénquima (fig. 7a y b), análoga a la encontrada en el área branquial de embriones del estadio 24-25. En algunos cultivos se encontró que el endodermo se desarrollo contactando el medio externo (fig. 7b).

El análisis inmunocitoquímico mostró reacción positiva en el ectodermo y endodermo con KS pan (fig. 8a y b) y ck 8.13; en el endodermo, parte del ectodermo y con menor intensidad en las células musculares, con anti-citoqueratinas 8, 18, 14 (fig. 8c) y 19 (fig. 8d). Con la anti-citoqueratina 7 se observó una reacción débil en el endodermo; se detectó expresión de vimentina en el endodermo, ectodermo y mesénquima, y con mayor intensidad en las células musculares. Se observó reacción positiva con anti-actina en las células mesenquimáticas y parte del ectodermo, mientras que con actina sarcomérica se encontró marcación en el endodermo y un punteado citoplasmático en el mesenquima. También en el mesénquima se detectó miosina, mientras que todos los tipos celulares presentaron una débil expresión de tubulinas α y β . Los controles negativos no mostraron fluorescencia.

C) esbozo completo (ecto-endo-mesodermo)

Los esbozos completos cultivados desarrollaron unas estructuras filamentosas cortas, similares a las que se observaron en las branquias externas de los controles, aunque sin ramificaciones (fig. 9). El análisis histológico evidenció una diferenciación tisular semejante a la observada en los controles: una doble capa epidérmica, grupos de células endodérmicas, cartílago, capilares y mesénquima (fig. 10).

El análisis inmunocitoquímico mostró los mismos resultados que en el grupo anterior.

Embriones Explantados

Con el objetivo de determinar la participación de las tres hojas embrionarias en el desarrollo de las branquias, se llevaron a cabo explantes de distintas porciones

del esbozo en embriones en el estadio de botón caudal y se siguió su desarrollo hasta estadios larvales (Tablas 3 y 4).

GRUPO	TIPO EXPLANTE	EMBRIONES OPERADOS	SOBREV	ST 21	ST I
A	ectodermo	32	32	12	20
B	endo-mesodermo	29	27	10	17
C	esbozo completo	34	32	14	18

Tabla 3: Grupos de embriones explantados, número de sobrevivientes y de individuos fijados en los estadios 21 y I.

GRUPO	TIPO EXPLANTE	Nº EMBRIO	BQ EXT.	BQ INT
A	ectodermo	32	0	32
B	endo-mesodermo	27	0	0
C	esbozo completo	34	0	0

Tabla 4: Desarrollo de las branquias en los embriones explantados. NRO EMB: número de embriones operados; BQ EXT: branquias externas; BQ INT: branquias internas.

A) En los embriones sometidos al explante de la capa ectodérmica branquial el ectodermo adyacente, al multiplicarse, cerró el área correspondiente al tejido explantado dejando a lo sumo una reducida cicatriz. No hubo diferenciación de branquias externas en el lado explantado, mientras que las branquias externas del lado contrario desarrollaron normalmente; en los casos en que se explantaron ambos esbozos, los embriones continuaron su crecimiento alcanzando estadios larvales. Sincrónicamente con el control, se desarrollaron tanto el opérculo como las branquias internas completas.

B) En los embriones sometidos al explante de los tejidos internos del esbozo (endo y mesodermo), el ectodermo branquial cubrió el área explantada y se unió al resto de la capa ectodérmica sin dificultad. Los embriones no desarrollaron branquias externas y apenas diferenciaron parte de las internas en algunos casos (fig. 10); el opérculo se formó normalmente y los embriones alcanzaron el estadio larval I.

C) En los embriones sometidos al explante del esbozo completo, el área explantada fue cerrada por el tejido adyacente; no se observó la formación de branquias externas (figs. 12 y 13) en el lado explantado. Tampoco se desarrollaron bien las internas, en algunos casos se encontraron estructuras reducidas correspondientes a los arcos branquiales I y IV (fig. 14); el opérculo se desarrolló normalmente y los ejemplares sobrevivieron hasta el primer estadio larval, aunque con un volumen menor al de los controles, especialmente en los casos en que fueron explantados ambos esbozos.

Transplantes

Con el objeto de analizar el estado de determinación del esbozo branquial se efectuaron diversos transplantes ectópicos en embriones del mismo estadio (Tablas 5, 6 y 7).

GRUPO	TEJIDO TRANSPLANTADO	EMBRIONES OPERADOS	SOBREV	ST 21	ST I
A	esbozo completo	32	31	12	19
B	endo-mesodermo	33	29	12	14

Tabla 5: Grupos de transplantes, número de embriones sobrevivientes y de ejemplares procesados en los estadios 21 y I.

GRUPO	TEJIDO TRANSPLANTADO	Nº. EMB.	DIFER	ECTOD	ENDOD	MESEN	MUSC	CART	CIRCUL
A	esbozo completo	12	11	11	11	11	3	0	9
B	Endo-mesodermo	12	9	0	9	9	2	0	7

Tabla 6: Grupos de embriones transplantados procesados en el estadio 21 y diferenciación de grupos celulares en los transplantes. DIFER: transplantes que diferenciaron estructuras celulares; ECTOD: ectodermo; ENDOD: endodermo; MESENQ: mesénquima; MUSC: músculo; CART: cartílago; CIRCUL: transplantes en los que se observó circulación.

GRUPO	TEJIDO TRANSPLANTADO	Nº. EMB.	DIFER	ECTOD	ENDOD	MESEN	MUSC	CART	CIRCUL
A	esbozo completo	19	13	0	13	13	12	11	12
B	endo-mesodermo	14	11	0	11	11	7	9	10

Tabla 7: Grupos de embriones transplantados procesados en el estadio I y diferenciación de grupos celulares en los transplantes. DIFER: transplantes que diferenciaron estructuras celulares; ECTOD: ectodermo; ENDOD: endodermo; MESENQ: mesénquima; MUSC: músculo; CART: cartílago; CIRCUL: transplantes en los que se observó circulación.

A) Transplantes externos: esbozo completo

Las operaciones fueron exitosas en un 91%; los transplantes pudieron ser localizados tanto por la fluorescencia del FDA como por la formación de filamentos evidentes macroscópicamente. Los transplantes de esbozos completos dieron origen a unos filamentos ramificados en forma similar y sincrónica a las branquias

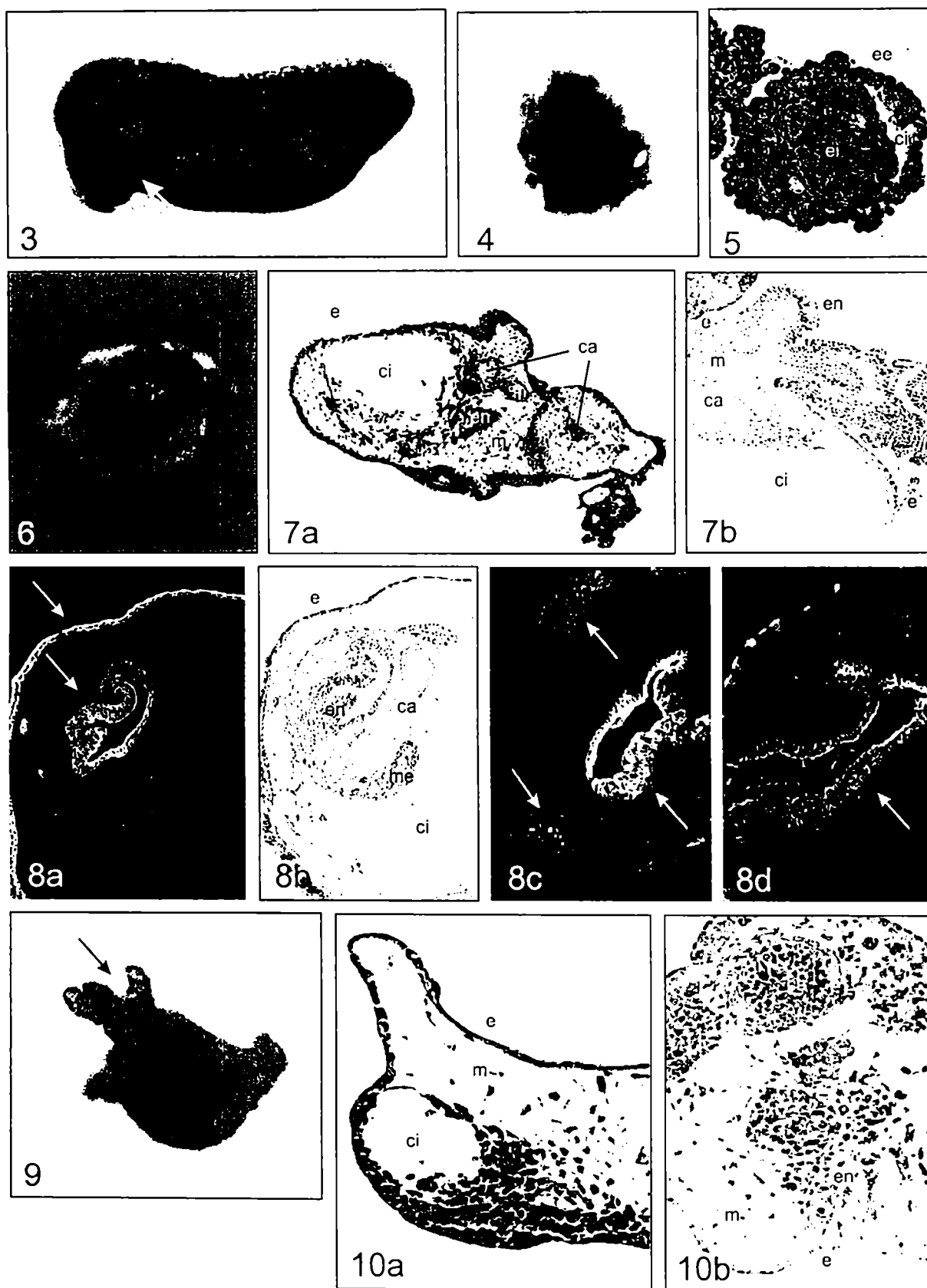
externas del huésped (fig. 15). Cabe señalar que cuando el trasplante se realizó en la región caudal se observó por transparencia (bajo lupa) circulación sanguínea en los filamentos. Algunos de los trasplantes presentaron signos de hidropesía (18%), que no interfirió con el desarrollo normal del huésped.

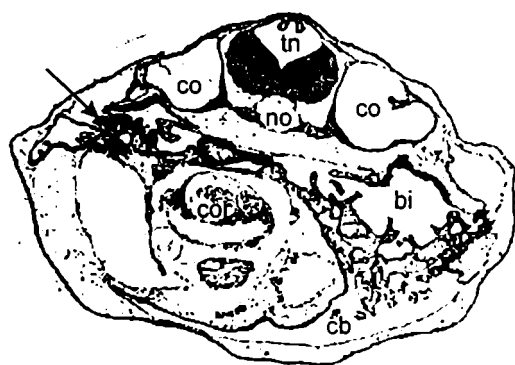
El análisis histológico de los trasplantes cuando el huésped alcanzó el estadio 21 evidenció la estructura epidérmica normal, epitelio endodérmico, capilares y mesénquima, en forma análoga a las branquias externas (fig.16), incluso se encontró en un par de trasplantes fibras musculares. Los resultados inmunocitoquímicos mostraron reacción positiva en el epitelio para la marcación con citoqueratinas (ck 8.13 y Kspan) pero negativa en el mesénquima para miosina, coincidiendo con las inmunomarcaciones realizadas en los controles en los mismos estadios

En los trasplantes que continuaron desarrollando hasta el estadio II, se observó la formación de filamentos hialinos, cortos y apenas ramificados (fig. 17) mientras que las larvas hospedadoras presentaban las branquias internas totalmente desarrolladas; también se observó por transparencia en estos filamentos circulación sanguínea. El análisis histológico evidenció en los filamentos de los trasplantes una estructura epitelial de origen endodérmico análoga a la de las branquias internas del hospedador y de los controles; también se encontraron estructuras cartilaginosas, mesénquima, células musculares y sanguíneas (fig. 18). El análisis inmunorreactivo resultó positivo tanto para las citoqueratinas en el epitelio (ck 8.13 y Kspan) como para la miosina en el mesénquima (fig. 19), de forma análoga a la observada en los controles del mismo estadio.

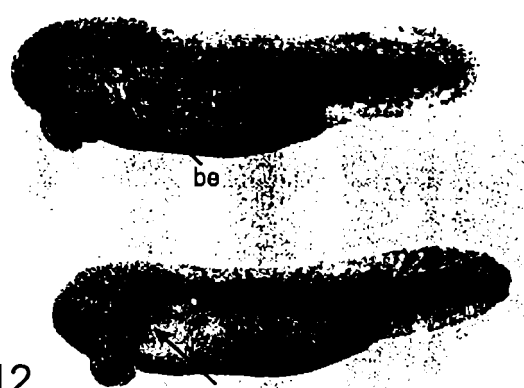
B) Trasplantes internos: endo-mesodermo

Las operaciones fueron exitosas en un 75%; se pudo observar por fluorescencia del FDA la ubicación de los trasplantes en los hospedadores vivos. Ningun trasplante desarrolló filamentos externos; el 33% de los embriones transplantados mostraron signos de hidropesía, lo que no impidió que alcanzaran el estadio I al igual que los controles.

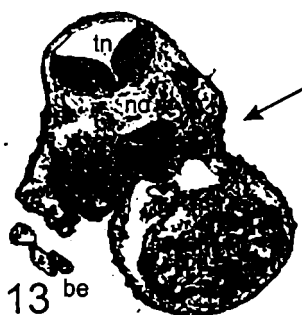




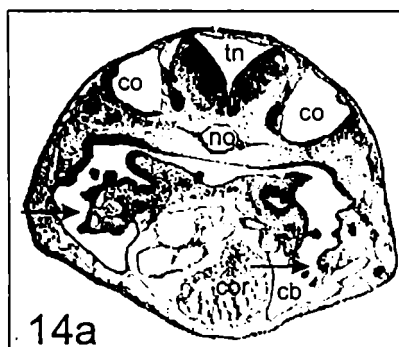
11



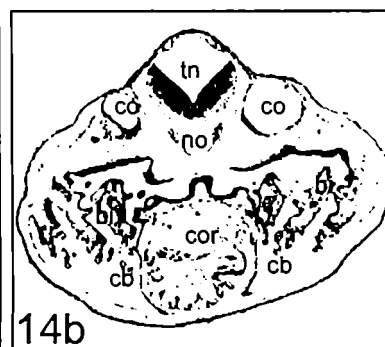
12



13



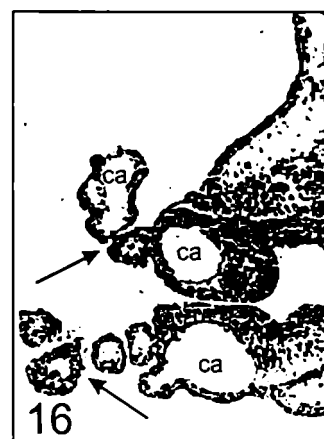
14a



14b



15



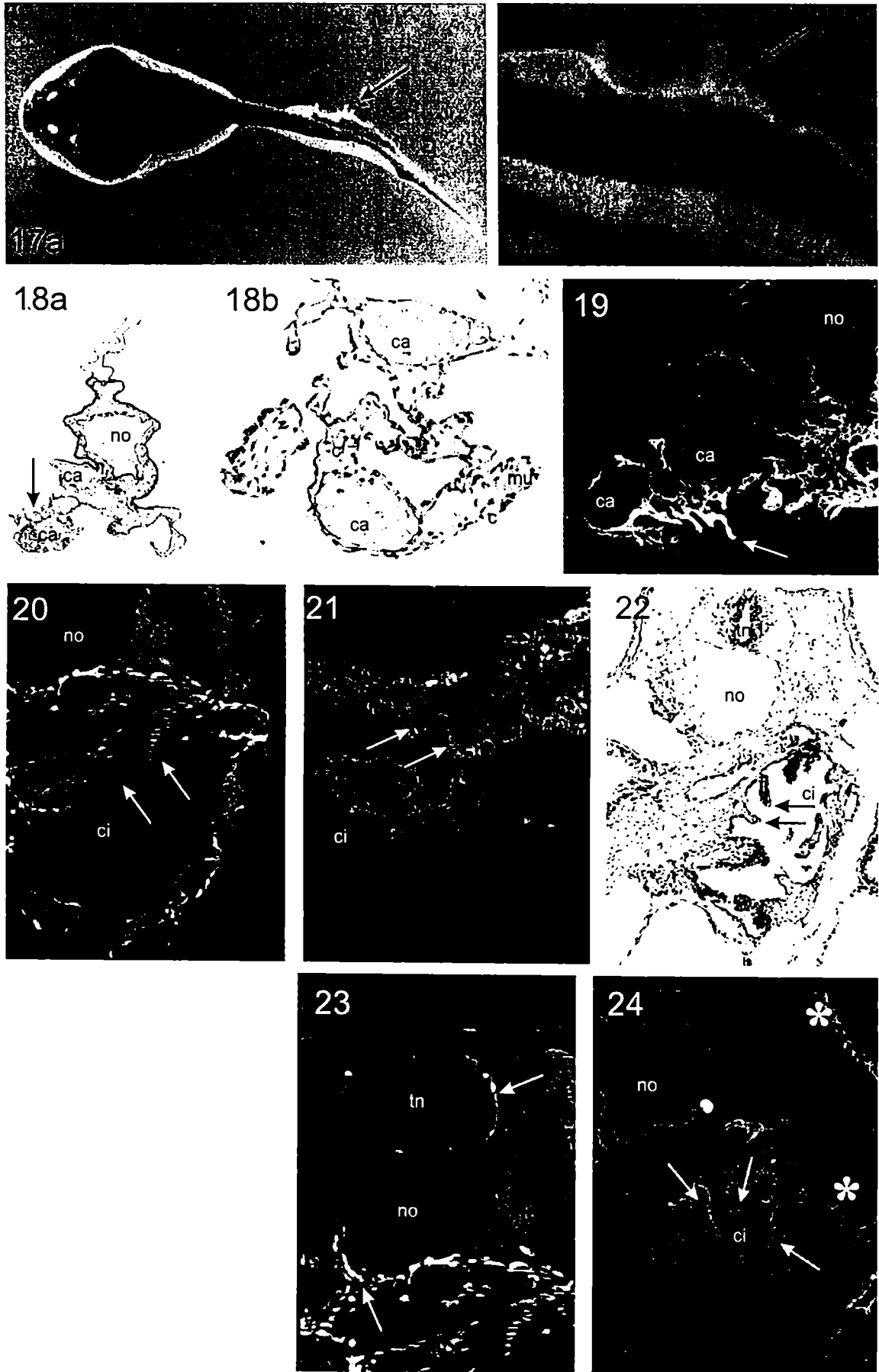
16

En los cortes histológicos, se localizaron los trasplantes por fluorescencia y se observó la formación de pequeñas cavidades en las que confluían filamentos simples o con pocas ramificaciones, que presentaron capilares y células sanguíneas (figs. 20 y 21); en la base de los filamentos se observaron estructuras cartilaginosas y rodeando las cavidades se encontraron membranas similares a los mesotelios. Estas observaciones coincidieron con las realizadas en los preparados después de ser coloreados con hematoxilina y eosina (fig. 22).

Si bien el epitelio de algunos trasplantes presentaba FDA (fig. 21) en otros casos el epitelio de los filamentos no mostraba fluorescencia, mientras que si fluorescían las células de origen mesodérmico (mesenquimáticas y cartilaginosas) (fig. 20). Una vez que fueron coloreados los preparados, se encontró que los filamentos no fluorescentes estaban mas avanzados en la diferenciación que los primeros por lo que probablemente el FDA se “diluyó” en las sucesivas progenies celulares.

Además, en los trasplantes mas avanzados se encontraron células fluorescentes en algunos tejidos del hospedador, como el conectivo, la membrana del tubo neural y en células bordeando la notocorda (fig. 23); estas observaciones evidenciaron la migración de células del trasplante y su integración con los tejidos del huésped.

Las inmunorreacciones fueron positivas con Ck 8.13 y Ks pan 1-8, tanto en los epitelios ecto y endodérmicos de los huéspedes como de los trasplantes (fig. 24); en el caso de la ck p. 14, se contró inmunomarcación en los filamentos originados por los trasplantes y en los epitelios de origen endodérmico de los huéspedes.



DISCUSIÓN

A pesar de ser protrusiones epidérmicas, el desarrollo de las branquias externas no depende solo del ectodermo ya que es necesaria su interacción en estrecho contacto con el mesodermo y endodermo del esbozo branquial; los datos experimentales que hemos reunido demuestran que las branquias externas no se desarrollan en ausencia de las bolsas faríngeas y los arcos viscerales. Este resultado corrobora los estudios realizados en *Amblystoma punctatum* que señalaron la importancia del endodermo para la diferenciación de las branquias externas, e incluso para su orientación (Harrison, 1921; Severinghaus, 1930; Balinsky, 1984), como así también del mesodermo en *Triton alpestris* (Mangold, 1937).

Por otra parte, no se ha observado desarrollo de branquias externas en embriones de *Bufo arenarum* sometidos al explante de ectodermo branquial: si bien el área explantada es recubierta por la proliferación del epitelio adyacente no se diferencian ningún tipo de estructura filamentosa; este resultado sugiere que el ectodermo del esbozo branquial ya se encuentra determinado en el estadio de botón caudal. En néurulas avanzadas de *Discoglossus pictus* (Anura) no se verifica el desarrollo de branquias externas aún cuando se sustituye el ectodermo branquial por ectodermo banal (Raunich, 1942); por lo tanto el proceso inductivo que determinara el ectodermo branquial se habría producido en estadios más tempranos.

En cuanto a aspectos fisiológicos de los embriones explantados, a pesar de haberse comprobado la participación de las branquias externas en el intercambio gaseoso (ver Capítulo 1), éstas parecen ser prescindibles para la vida embrionaria, ya que los individuos operados continúan su desarrollo en forma aparentemente normal. En cambio, si bien no se continuó la observación de los embriones

explantados durante la vida larval, la ausencia de branquias internas denotó una interferencia en el tamaño alcanzado por los individuos operados.

Los explantes de ectodermo branquial presuntivo de *Bufo arenarum* cultivados en forma aislada, diferenciaron una “epidermis atípica” similar a la descrita por Winklbauer (1988) para explantes de hemisferios animales de blástulas de *Xenopus laevis*; no hemos observado desarrollo de ningún tipo de estructuras filamentosas. Estos resultados difieren de los descritos por Ekman (1913) en *Bombinator* y *Rana*, y parcialmente de las observaciones realizadas por Raunich (1942) en *Bufo vulgaris*; ambos autores describieron la formación de pequeños y simples filamentos (no ramificados), que posteriormente se atrofiaban o se presentaban edematosos y se reabsorbían; aunque se podría atribuir la divergencia de los resultados a diferencias específicas, consideramos que es factible que en los experimentos de Ekman y Raunich, el ectodermo presuntivo no haya sido completamente aislado de células de origen endo y mesodérmico, las que al permanecer en el explante pueden haber inducido la formación de filamentos.

Por otra parte, existe cierta coincidencia entre la capacidad de diferenciación de nuestros explantes de epitelio ectodérmico y los descritos en Urodelos; en este caso, el transplante de ectodermo branquial solo ocasionó la aparición de protuberancias atípicas en los tejidos del huesped, sin ningún indicio de estructuras tipo filamentosas (Harrison, 1921; Severinghaus, 1930; Moser, 1940).

En *Bufo arenarum* las bolsas faríngeas y los esbozos de los arcos viscerales, los tejidos internos del esbozo branquial de origen endo y mesodérmico, se encuentran especificados en el estadio de botón caudal: el cultivo organotípico de los mismos mostró que son capaces de diferenciar en presencia de ectodermo banal, adquiriendo características inmunocitoquímicas análogas a las mostradas por las branquias externas e internas embrionarias. Sin embargo no se observó que este endo-mesodermo del esbozo branquial indujera el desarrollo de filamentos en el ectodermo banal de néurulas utilizado como “envoltura” del sandwich; en estudios anteriores, Schmidt (1937) describió la formación de filamentos en su

trabajo con esbozos branquiales de *Triton* y ectodermos de gástrulas. Estos resultados evidencian que la competencia del ectodermo se produciría en estadios mas tempranos al de néurula; es destacable nuevamente que, pese a haber adquirido la mencionada competencia en estadios anteriores al de botón caudal, el epitelio ectodérmico del esbozo no es capaz de diferenciar alguna estructura filamentosa en ausencia del endo-mesodermo del esbozo.

El cultivo del esbozo branquial completo exhibió la misma capacidad de diferenciación que los cultivos en sandwich de los tejidos internos del esbozo; además se observó el desarrollo de pequeños filamentos similares estructuralmente a los desarrollados en las branquias externas. Estos resultados se deberían a la presencia contemporánea del endo- mesodermo en los explantes cultivados.

La determinación y la capacidad de diferenciación del esbozo branquial en el estadio de botón caudal tambien se corroboró con el desarrollo de los trasplantes ectópicos; éstos desarrollaron en forma similar a los controles, con la aparición sucesiva de filamentos análogos a los de las branquias externas e internas de las larvas hospedadoras y la diferenciación histológica de otras estructuras branquiales. En todos los casos se comprobó que estas estructuras fueron originadas por las células del trasplante, ya que tanto en las larvas vivas como en los cortes histológicos, los filamentos presentaron la fluorescencia correspondiente al FDA. El análisis inmunocitoquímico además demostró que la expresión de citoqueratinas y miosina en los trasplantes se correspondía con los estadios de diferenciación de los controles.

El desarrollo de los trasplantes efectuados en este trabajo corrobora los resultados descriptos para *Rana fusca* y *Discoglossus pictus* (Raunich, 1942); sin embargo, en el trasplante de *Bufo arenarum* no hemos observado la formación del opérculo, lo que podría atribuirse a una diferencia específica o con mayor probabilidad al no haber sido incluída el área presuntiva respectiva en el explante realizado.

La utilización de trasplantes de esbozos de órganos en estadios embrionarios, ha permitido estudiar además del estado de determinación de los mismos, la posibilidad de sobrevivencia y desarrollo de los tejidos explantados en localizaciones ectópicas, así como la integración de elementos celulares del donante y el huésped (Koo y Graziadei, 1995). Los resultados de nuestro trabajo experimental mostraron una buena tasa de sobrevivencia de los trasplantes, ya que esta fue mayor al 75%; por otra parte, se encontraron células provenientes de los trasplantes integradas a estructuras histológicas del huésped, especialmente en epitelios y tejido conectivo, sin interferir con la actividad normal de los embriones transplantados.

Los resultados expuestos demuestran que el esbozo branquial de *Bufo arenarum* constituye un modelo práctico de estudio de algunas de las interacciones de las tres hojas embrionarias en estadios tempranos de la organogénesis, a pesar de la complejidad estructural de este tipo de esbozo que no permite la aislación completa del endo y mesodermo presuntivo branquial.

Capítulo 5

PRESENCIA DEL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL EN LAS BRANQUIAS INTERNAS

INTRODUCCION

Factor Natriurético Atrial (FNA) o Péptido Natriurético Atrial es el nombre genérico utilizado para una familia de péptidos vasodilatadores, diuréticos y natriuréticos, inicialmente descubiertos y estudiados en el atrio del corazón de los mamíferos (ratas) por De Bold y colaboradores (1981). Los cardiocitos atriales sintetizan una prohormona de 126 aminoácidos (Zivin *et al*, 1984) que genera, a través de un clivaje proteolítico, un péptido de 28 aminoácidos, la forma biológica activa del FNA (Arendt *et al*, 1985; Thibault *et al*, 1985). Los estudios fisiológicos realizados han mostrado que los FNAs son muy importantes en la regulación osmomineral para mantener la homeostasis de sales y agua en los fluidos corporales.; FNA es la primer hormona conocida que se caracteriza por sus propiedades diuréticas y natriuréticas, contrarrestando el accionar de hormonas como la vasopresina y la angiotensina II. Los FNAs producen diuresis y natriuresis por medio del incremento de la tasa de filtración del glomérulo renal, disminuyendo la producción de aldosterona adrenal y catecolaminas, relajando el músculo liso e inhibiendo la liberación de hormonas neuro y adenohipofisarias (Kloas, 1993).

Posteriormente a los primeros trabajos realizados en mamíferos, se demostró que los FNAs se encuentran tanto en la aurícula como en el ventrículo del corazón de larvas (Hirohama *et al*, 1989) y adultos de anfibios (Netchitailo *et al*, 1986a, 1988; Aoki *et al*, 1988; Uemura *et al*, 1989), y específicamente en *Bufo arenarum* (Casco *et al*, 1992). Estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos han mostrado la presencia de FNA en cierto número de tejidos extracardíacos en diversos vertebrados, incluidos anfibios: en vasos sanguíneos (Asai *et al*, 1987), en corazones linfáticos (Ryu *et al*, 1992), en glándulas salivales (Cantin *et al*, 1984), glándulas adrenales (Ong *et al*, 1987; Lhirmann *et al*, 1988; Morel *et al*, 1988; Reinecke *et al*, 1992), en ovario (Kim *et al*, 1989), en espermatozoides (Paz *et al*, 1993), en el cerebro de mamíferos (Tanaka *et al*, 1984; Jacobowitz *et al*, 1985;

Kawata *et al*, 1985; Ueda *et al*, 1988) y de anfibios (Netchitailo *et al*, 1986 b, 1987; Feuilloley *et al*, 1993; Vallarino *et al*, 1998). Por otra parte, también el gen que codifica para el FNA ha sido hallado en distintos órganos (Gutkowska y Nemer, 1989). A pesar de los numerosos trabajos realizados en vertebrados adultos, es muy pobre aun el conocimiento de la ontogenia de estas localizaciones extra-cardíacas del gen y su expresión, especialmente en vertebrados inferiores.

La secuencia de aminoácidos del FNA ha sido determinada en las ranas (Lazure *et al*, 1988; Sakata *et al*, 1988); su comparación con las conocidas en peces (Takei *et al*, 1989; Schofield *et al*, 1991), en pollos (Miyata *et al*, 1988) y en mamíferos (Arendt *et al*, 1985; Thibault *et al*, 1985), revela que la estructura de los FNAs ha sido altamente conservada durante la evolución del phylum Vertebrados.

La actividad biológica del FNA en anfibios adultos no ha sido aclarada aún; Chiu y colaboradores (1990) han demostrado que el FNA presenta un efecto vasorelajante en fragmentos arteriales aislados a partir de loops aórticos, de la aorta dorsal, y de las arterias ilíacas y femorales de *Rana catesbeiana* y *Rana tigrina*. También algunos trabajos realizados *in vivo* han demostrado que no existe un efecto fisiológico significativo del FNA de rata en el funcionamiento renal de los anfibios (Frick y Toygar, 1988). Ha sido sugerido que los FNAs pueden jugar un rol neuroendócrino en los anfibios, tomando en cuenta la presencia de fibras nerviosas FNA-inmunoreactivas en el núcleo preóptico y en la eminencia media de adultos de *Rana ridibunda* (Netchitailo *et al*, 1987) y la alta densidad de receptores para FNA en la hipófisis (Tong *et al*, 1989); además, estudios inmunocitoquímicos realizados durante el desarrollo del cerebro de *Rana esculenta*, han establecido que los FNAs podrían encontrarse involucrados en la regulación de las secreciones hiposirarias de las larvas (Vallarino *et al*, 1998). Por otra parte, ciertos trabajos establecieron que el FNA estimula la secreción de la hormona α -melanocito estimulante (MSH) desde la hipófisis (Lamacz *et al*, 1987), mientras que otros estudios mas reciente han

sugerido que existe una relación entre el FNA y la liberación de GnRH (Huang y Samson, 1991; Paz *et al*, 1993),

En las branquias internas de renacuajos de *Rana catesbeiana* ha sido descrita la presencia y distribución de varios neuropéptidos (CGRP, sustancia P, VIP y somatostatina), los cuales podrían estar involucrados en la modulación del transporte iónico (Kusakabe y Kawakami, 1992). Además, a través de estudios de autoradiografía se han detectado receptores específicos para FNA en la piel, branquias, vasos sanguíneos, hipotálamo y en el mesencéfalo de larvas de *Rana dalmatina*, mientras que en el inicio de la metamorfosis se encontraron también receptores en los túbulos pronefricos, en el epitelio intestinal y en los músculos estriados (Ghiani *et al*, 1991); sin embargo, hasta el momento no se había reportado la expresión de FNA en branquias de embriones o larvas de anuros.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la expresión del Factor Natriurético Atrial durante la ontogenia de la branquias de *Bufo arenarum*, mediante análisis inmunohistoquímicos y ultraestructurales.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Obtención y Mantenimiento de Animales Adultos

Ver Capítulo 1.

Obtención y Mantenimiento de Embriones

Ver Capítulo 1

METODOS DE ESTUDIO

Técnicas Inmunocitoquímicas

Los embriones y larvas fueron fijados por inmersión en líquido de Bouin durante 3 hs (90' a 4°C y 90' a temperatura ambiente), luego los ejemplares fueron lavados y conservados en alcohol 70° a 4°C.

Una vez fijados los ejemplares fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes, mezcla de alcohol-xilol y por último dos baños de xilol, e incluídos en una mezcla de parafina-cera de abejas (56°C). De las piezas seleccionadas se realizaron cortes seriados en sentido transversal, con un espesor de 6µm, utilizando un micrótomos Leitz; Los cortes fueron montados y mantenidos una semana a 30°C para su total secado.

Las secciones fueron desparafinadas en xilol, hidratados en una serie descendente de alcoholes y en buffer fosfato salino 0,1M (PBS), pH 7.4, durante 30'; para inhibir la actividad de peroxidasas endógenas, los cortes fueron tratados con una solución de 3% de H₂O₂ en PBS durante 10', y enjuagados en PBS varias

veces. Para bloquear eventual actividad inespecífica de otras proteínas, los cortes fueron inmersos en una solución 5 % de leche descremada, 0,02% de Tritón X-100 en PBS durante 40', y enjuagados en PBS.

El anticuerpo primario utilizado fue anti- α -hANP 99-126 (SIGMA, St. Louis, MO) desarrollado en cabra, diluido 1:600 en PBS; se aplicó sobre las secciones histológicas con una jeringa Hamilton, las que fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C durante 16 h.

Se efectuaron dos tipos de "controles negativos" para probar la especificidad del anticuerpo primario:

- aplicación del anticuerpo primario adsorbido previamente con hANP (SIGMA) en exceso, durante 24 h a 4°C;
- omisión del anticuerpo primario y aplicación de PBS en su lugar.

Después de lavarlos en PBS, los cortes fueron tratados nuevamente con la solución de leche descremada y Triton durante 60' y lavados nuevamente con PBS. Se aplicó luego el método de detección del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC): las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con el anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido en PBS, durante 30-60' a temperatura ambiente, lavados en PBS, e incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, 30-60' a temperatura ambiente.

Luego las secciones fueron lavadas en PBS y reveladas con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y H_2O_2 para detectar la peroxidasa. El seguimiento del proceso de revelado se llevó a cabo en el microscopio; la reacción fué detenida en agua destilada, las secciones deshidratadas en una serie ascendente de alcoholes, clarificadas en xilol y montados con el medio sintético DPX (Fluka, Suiza). Los preparados fueron observados y fotografiados en el fotomicroscopio Polyvar (Reichert-Jung), utilizando película TMax 100 (Kodak), Kodak Gold 100 o Fujicolor 100.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Para efectuar estudios ultraestructurales, las larvas fueron fijadas *in toto* en una solución 3% paraformaldehído, 3% glutaraldehído, 0,1% ácido pícrico en buffer fosfato 0,1M, pH 7.2, durante 4 h a 4°C.

Las branquias fueron extraídas por microdisección en la misma solución fijadora, lavadas con tampón cacodilato 0,1M, con agua destilada y postfijadas en solución acuosa de tetróxido de Osmio 1% durante 1h a temperatura ambiente. Después de lavarlas con agua destilada, fueron coloreadas *in bloc* con solución acuosa de acetato de uranilo 2% durante 2 h.

Las piezas fueron deshidratadas en una serie ascendente de acetonas, incluidas en Durcupan ACM (Durcupan ACM Kit, FLUKA) y cortadas utilizando un ultramicrotomo Porter Blum MT-1. Las secciones fueron montadas en grillas de cobre, contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Venable y Coggesall, 1965) y examinadas en un microscopio electrónico HITACHI HU 11-C.

RESULTADOS

Con el objeto de conocer la eventual expresión de FNA en las branquias de *Bufo arenarum*, se aplicó la técnica de inmunocitoquímica en embriones desde el estadio 20 hasta larvas premetamórficas del estadio VIII; el anticuerpo utilizado en este trabajo había sido empleado anteriormente con éxito para demostrar la presencia de FNA durante la embriogénesis en el corazón de la misma especie (Casco *et al*, 1992). Además se efectuó una análisis ultraestructural de la morfología branquial para localizar la distribución de gránulos secretorios, análogos a los encontrados en el corazón.

Análisis Inmunocitoquímico

No se encontró inmunoreacción en las branquias externas embrionarias ni en las branquias internas del estadio larval I; en estos estadios se observó coloración positiva en el corazón, de acuerdo con lo descrito anteriormente para esta especie (Casco *et al*, 1992).

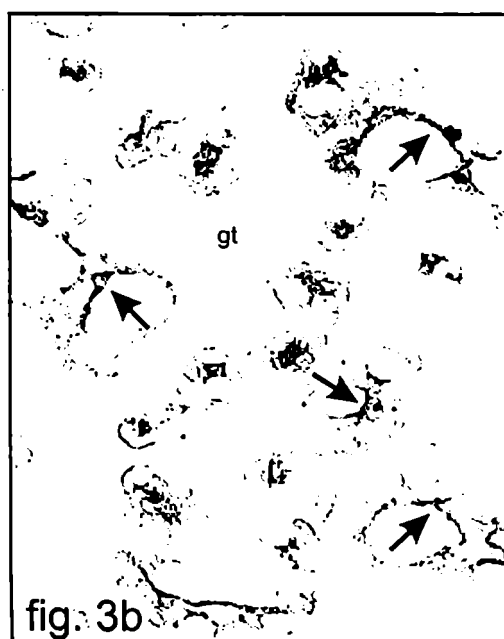
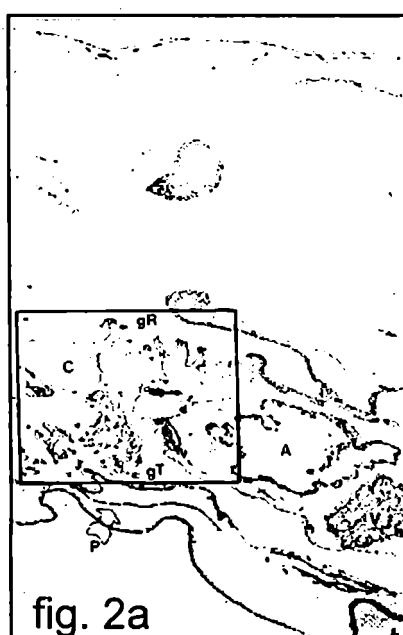
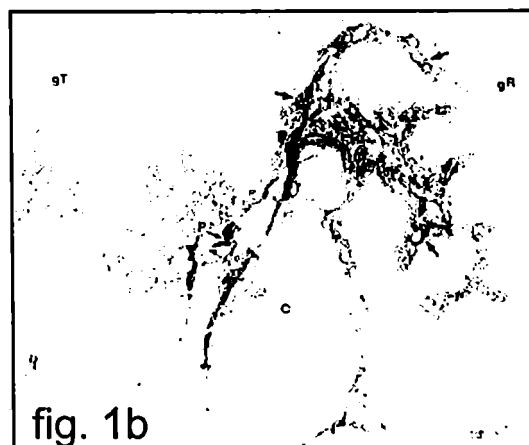
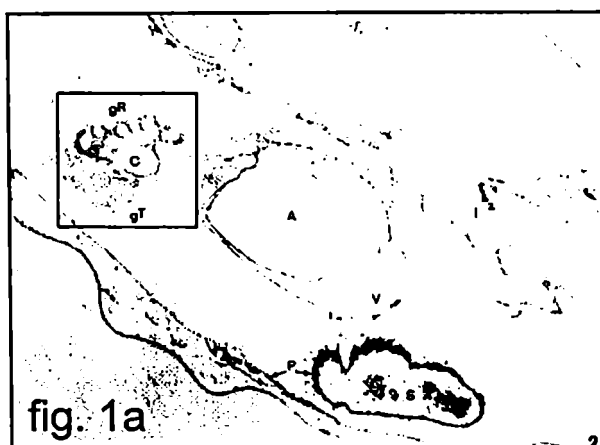
A partir del estadio larval II y hasta el estadio VIII se detectaron varias regiones inmunoreactivas en las branquias internas (Fig. 1 a 3) , similares a la coloración mostrada por la aurícula y el ventrículo (Fig. 1a y 2a). La ausencia de marcación en cortes adyacentes en que se omitió el anticuerpo primario o se lo preadsorbió con hFNA en exceso, indicaron la especificidad de la reacción (Fig. 2b).

En los estadios mas tempranos, las células inmunoreactivas fueron encontradas principalmente en la capa subepitelial de los filtros branquiales y rodeando al ceratobranquial (Fig. 1b); la inmunomarcación se observa como una compleja red que no alcanza al epitelio. La fuerte coloración fué restringida al citoplasma celular, y examinada a altos aumentos posibilitó la observación de fantasmas nucleares y la naturaleza granular de los precipitados de diaminobencidina. En estos estadios no se detectó reacción positiva en los filamentos respiratorios.

En estadios premetamórficos mas avanzados tanto los filtros como los filamentos branquiales mostraron inmunoreactividad (Fig. 2 y 3); tambien en los filamentos respiratorios la inmunomarcación se encontró en el tejido conectivo subepitelial, como unas finas hebras rodeando los capilares (Fig. 3b).

Análisis Ultraestructural

En los estadios embrionarios 19 a 24 no se encontraron gránulos secretorios en el área branquial mientras que en el corazón, los gránulos se han observado a partir del estadio 19 (Casco *et al*, 1992); las células epiteliales de las branquias

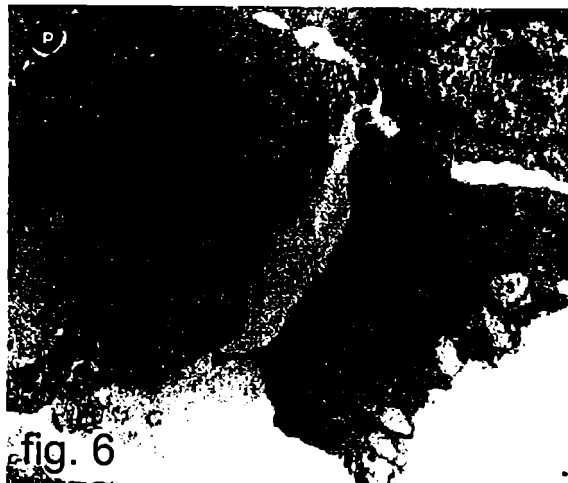


presentaron núcleos redondeados u ovoides, numerosos gránulos de pigmento, plaquetas vitelinas y gotas lipídicas, evidenciando un estado de diferenciación temprana (Fig. 4).

En el estadio I, la ultraestructura reveló que las células epiteliales en proceso de diferenciación mostraban aún numerosas gotas lipídicas cubriendo grandes áreas del citoplasma, así como gránulos de pigmento, mientras que ya no se encontraron plaquetas vitelinas (Fig. 5 y 6). Estas células parecen encontrarse en una fase de gran actividad, de acuerdo con el notorio desarrollo de organelas proteinopoyéticas, especialmente el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático; tampoco se observaron gránulos de FNA en este estadio.

En los estadios inmunorreactivos (a partir del estadio II), el epitelio bilaminar de los filtros dorsales presentó dos tipos celulares: las células oscuras y las claras (Fig. 7 a 9). Las primeras, que tienen un citoplasma electrodenso, son células cúbicas, apicales o basales, y pavimentosas laterales con numerosas mitocondrias polimórficas. Estas células mostraron también un núcleo condensado y con indentaciones, y en su superficie apical presentaron microvellosidades cubiertas con una cubierta difusa en la porción libre y numerosas vacuolas que contenían un material transparente similar a fluídos surfactantes (Fig. 8). Las membranas celulares laterales se encontraron recurvadas y con numerosos procesos citoplasmáticos extendiéndose hacia los espacios intercelulares (Fig. 9).

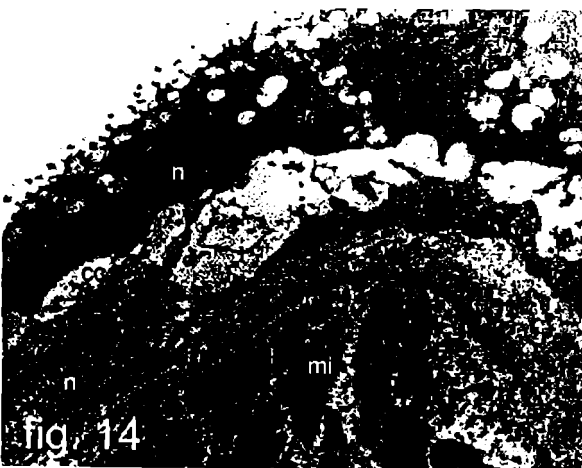
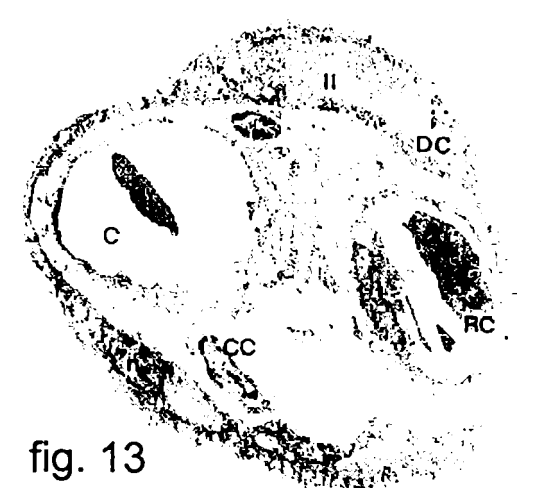
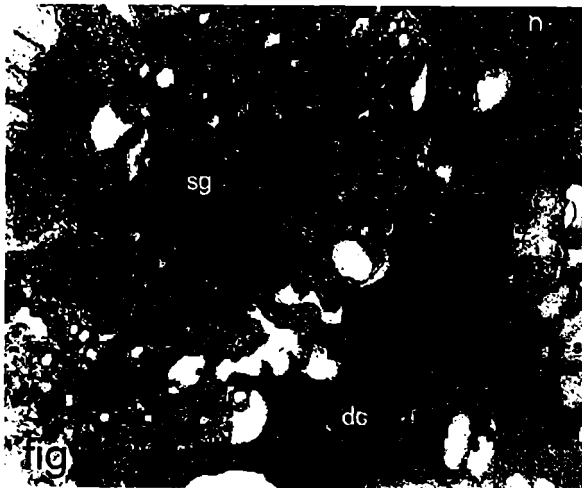
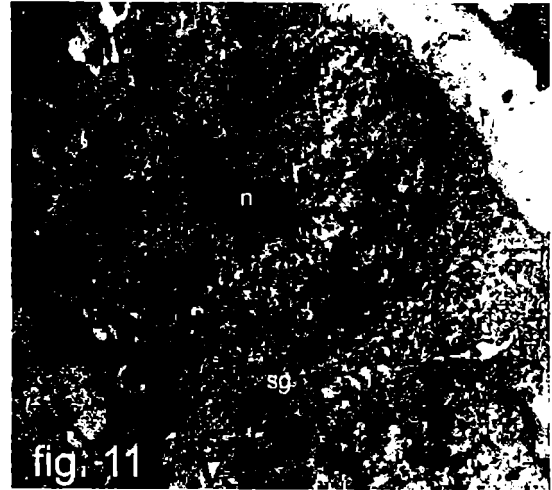
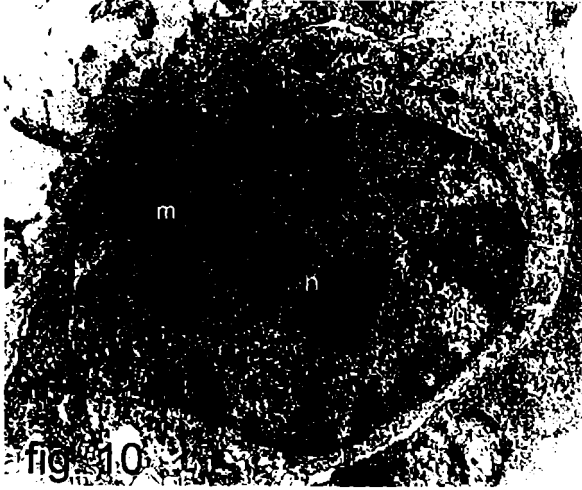
En las células claras el citoplasma presentó baja electrodensidad y se observaron grandes núcleos lobulados; se encontraron numerosas mitocondrias polimórficas, con una matriz densa y abundantes cristales; algunas de estas células presentaron gránulos secretorios en el área perinuclear, análogos a los gránulos FNA-inmunorreactivos encontrados en el atrio y ventrículo de células mioendócrinas de la misma especie (Fig. 10 y 11). Estos gránulos tenían una forma oval o redondeada, con un diámetro entre 100 y 150 nm; también se encontraron gránulos irregulares en las áreas telonucleares del citoplasma, sin una ubicación determinada (Fig. 12). Bajo el epitelio, se observó siempre la lámina basal.



Las crestas branquiales están compuestas por un eje con numerosas ramificaciones, bien vascularizadas con numerosos capilares que los atraviesan; los filamentos están compuestos de un epitelio bilaminar de células escamosas, similares a las encontradas en la porción ventral de los arcos branquiales y los ejes de las crestas branquiales (Fig. 13). Estas células se conectan con sus vecinas a través de uniones estrechas en su porción apical y repliegues laterales y basales irregulares, los cuales se interdigitan mutuamente. En ocasiones se observaron grandes espacios intercelulares en las porciones laterales y basales; la lámina basal y una capa de matriz extracelular fueron siempre observados por debajo del epitelio.

El epitelio de las crestas branquiales se adelgaza hacia el extremo de los filamentos; las células externas de la bicapa se hacen planas y elongadas, y los procesos citoplasmáticos de las células internas forman una capa muy fina que rodea el endotelio de los capilares. El núcleo de las células epiteliales y del endotelio generalmente se ubica en la zona media del filamento, entre los capilares aferentes y eferentes. Además entre los capilares se observó en la mayoría de los casos una célula soporte. La membrana celular presentó pocas microvellosidades y no se observaron vesículas con líquido. La lámina basal del epitelio se encontró en contacto directo con la lámina basal del endotelio de los capilares.

En forma similar al epitelio de los filtros branquiales, en el epitelio de las crestas se encontraron dos tipos de células, las claras y las oscuras; en este caso, ninguna de las dos mostró estructuras similares a los gránulos secretorios de FNA (Fig. 14 y 15).



DISCUSIÓN

Los resultados inmunocitoquímicos en larvas de *Bufo arenarum* con anticuerpos contra FNA proveen evidencia acerca de la presencia de este péptido en las branquias de anfibios; por otra parte, la detección con un antisuero de FNA humano implicaría una analogía en la secuencia aminoacídica a través de la evolución de los vertebrados, coincidiendo con lo determinado para el género *Rana* (Lazure *et al*, 1988; Sakata *et al*, 1988).

En *Bufo arenarum*, el FNA ha sido encontrado en el corazón embrionario (estadios 19 a 25) y se ha sugerido que podría jugar un papel clave durante este período del desarrollo en que los embriones comienzan a independizarse de los nutrientes provistos por el vitelo (Casco *et al*, 1992).

Kusakabe y Kawakami (1992) han reportado la presencia de varios neuropéptidos en fibras nerviosas que corren a lo largo de los capilares en los filamentos branquiales de renacuajos de *Rana catesbeiana*, sugiriendo que podrían estar involucrados en la modulación del transporte iónico. En forma similar, en el presente trabajo se ha demostrado la presencia de FNA-inmunoreactividad en las branquias internas de larvas premetamórficas de *Bufo arenarum*, desde el estadio II al VIII, en que estos órganos muestran un grado avanzado de diferenciación. A nivel del microscopio electrónico se han encontrado estructuras granulares en las células subepiteliales de los filtros branquiales, similares a los gránulos secretorios de FNA presentes en el corazón de la misma especie.

Aunque previamente a este trabajo se encontraron receptores para FNA en branquias de *Rana dalmatina*, solo se encontró inmunorreacción contra FNA limitada al corazón y en algunas áreas cerebrales en los primeros estadios, mientras que en los avanzados se encontró inmunorreactividad en el hipotálamo y algunos núcleos del mesencéfalo (Ghiani *et al*, 1991). En este caso se ha sugerido que durante el desarrollo algunas células indiferenciadas serían capaces de

sintetizar FNA, mientras que a partir de la metamorfosis sólo ciertas células ubicadas en áreas especiales retienen esa capacidad.

El significado funcional del FNA en las células branquiales constituye un interrogante de sumo interés, que no puede ser aclarado actualmente debido a que no existe evidencias de que el FNA encontrado por inmunocitoquímica sea sintetizado por las mismas branquias; no puede ser excluída la hipótesis de una eventual captura de estos péptidos desde el fluido intersticial, realizado por las células del epitelio branquial. Algunos trabajos recientes han demostrado la ocurrencia de una alta densidad de receptores para el FNA en las células cloruro de las branquias de peces (Uva *et al*, 1993; Kloas, 1993) y un efecto fisiológico del FNA en la secreción de cloruro sobre el epitelio branquial de teleosteos (Scheide y Zadunaisky, 1988); estos resultados indicarían que las branquias podrían ser consideradas importantes órganos blanco del FNA.

El efecto fisiológico promovido por FNA en las células blanco es mediado por un incremento del nivel intracelular de cGMP, a través de la activación de una guanilato ciclase acoplada a sus receptores específicos con los cuales es copurificada (Tei *et al*, 2000). Mediante la aplicación de una técnica citoquímica, estos autores determinaron la presencia de guanilato ciclase con posterioridad a la estimulación con FNA exógeno en las branquias internas de larvas premetamórficas de *Bufo bufo*. Sus resultados indicarían, indirectamente, la presencia de receptores para FNA en las branquias; los productos de la reacción detectados por Tei *et al* (2000) se encontraron a nivel de las membranas de las células epiteliales tanto de los filtros como de los filamentos respiratorios. En ambos casos, fueron localizados en las zonas de las membranas laterales entre las células de la capa externa del epitelio bilaminar y entre las membranas celulares de ambas hojas epiteliales. La presencia de guanilato ciclase fue especialmente abundante a lo largo de las membranas que yacen bajo los amplios espacios intercelulares, característicos de los epitelios involucrados en intercambio acuoso y salino, e indicadores de la acumulación de líquidos.

Algunos autores han sugerido que el FNA participa en la adaptación de una especie eurihalina, la anguila, a diferentes salinidades del medio ambiente (Broadhead *et al*, 1992); los niveles de este péptido en el corazón de la anguila son alterados con el cambio de salinidad y la naturaleza de los receptores presentes en las células epiteliales responsables del transporte sodio-cloruro, cambia en respuesta a la necesidad tanto de absorber como de eliminar cloruro y sodio. Por otra parte, se ha encontrado que la branquias de truchas son uno de los sitios principales de extracción de FNA y que receptores tipo C se encuentran involucrados en este proceso (Olson y Duff, 1993).

Aunque la piel de los anuros adultos es el sitio principal de intercambio iónico con el medio externo, en las larvas la epidermis no parece participar activamente en el transporte iónico transepitelial. Se ha demostrado que el epitelio de la cámara branquial en larvas de *Rana catesbeiana*, es el principal lugar de acumulación activa de Na^+ y Cl^- , así como de excreción de amonio y bases (Dietz y Alvarado, 1974). Por otra parte, estudios ultraestructurales de las branquias de *Discoglossus pictus* y *Rana cancrivora* han demostrado la presencia de células ricas en mitocondrias, similares a las presentes en peces teleosteos, y ha sido sugerida su participación en procesos de intercambio iónico (Hourdry, 1974; Uchiyama *et al*, 1990b).

Las larvas de *Rana cancrivora* son las únicas larvas de anfibios capaces de habitar aguas salinas (Gordon y Tucker, 1965); se ha determinado que tanto los embriones tempranos como los renacuajos en clímax metamórfico, no pueden adaptarse bien a altas salinidades del medio ambiente debido a la falta de branquias en estadios tempranos y a la pérdida de las mismas durante la metamorfosis (Uchiyama *et al*, 1990a, 1990b). También se han observado en esta especie grandes variaciones en la ultraestructura de las branquias internas en renacuajos aclimatados a un amplio rango de salinidad del medio ambiente sugiriendo que las branquias actuarían en la osmorregulación en medio ambientes eurihalinos (Uchiyama y Yoshizawa, 1992).

Por lo tanto, el conjunto de todas estas observaciones sugiere que las branquias de anuros serían capaces de participar en el intercambio iónico y los procesos de osmorregulación de las larvas, de manera similar a la que se observa en el epitelio branquial de los peces.

CONCLUSIONES

Los embriones de *Bufo arenarum* poseen tres pares de branquias externas bien desarrollados y un cuarto par muy pequeño aparentemente activo; las branquias se encuentran separadas por tres pares de hendiduras funcionales. Antes de la desaparición de estos órganos, se desarrollan cuatro pares de branquias internas que se encuentran situadas en dos cámaras branquiales, una a cada lado del corazón; cada branquia esta constituida por un arco branquial cartilaginoso en el que se insertan los filamentos respiratorios en posición ventral y los filtros branquiales en posición dorsal, mostrando diferentes patrones de inserción los cuatro ceratobranquiales de cada lado.

El análisis histológico efectuado en estadios embrionarios y larvales ha mostrado células en activa proliferación y diferenciación tanto en las branquias externas como en las internas, a medida que disminuyen progresivamente los gránulos de pigmento y las plaquetas vitelinas; estas observaciones han sido corroboradas por las efectuadas a nivel ultraestructural en que las células mostraban estadios de diferenciación temprana con grandes gotas lipídicas y gran desarrollo de las organelas proteinopoyéticas, y por los resultados inmunorreactivos utilizando marcadores moleculares de proliferación en los mismos estadios.

La muerte celular programada o apoptosis se encuentra involucrada en la degeneración de las branquias externas, observandose un aumento del número de células afectadas por este proceso desde el final de la etapa embrionaria hasta el comienzo de la vida larval; las observaciones histológicas coinciden con la detección de fragmentos de ADN a través del método TUNEL, específico para poner en evidencia células apoptóticas.

En el presente trabajo se ha demostrado también la presencia de un citoesqueleto bien desarrollado en los tejidos branquiales, a través de la detección

de diferentes proteínas en todos los estadios estudiados; si bien la distribución de actinas, miosina y tubulinas varía durante la diferenciación de los epitelios branquiales, la expresión de vimentina y de citoqueratinas pequeñas (7, 8, 18 y 19), características de epitelios simples en vertebrados superiores, fue constante a lo largo de los estadios. La inmunodetección para las citoqueratinas de bajo peso molecular demostró la presencia de las mismas no solo en los epitelios branquiales, sino también en otros tejidos que en vertebrados superiores expresan primariamente vimentina, como el endotelio de los vasos sanguíneos y algunas células musculares.

Los resultados experimentales del presente estudio denotan que los esbozos branquiales de esta especie se hallan determinados en el estadio de botón caudal, siendo capaces de autodiferenciar tanto en condiciones de cultivo como transplantados en un área ectópica del embrión, mostrando estructuras histológicas típicas del sistema branquial y expresión análoga de proteínas del citoesqueleto a las observadas en los embriones controles.

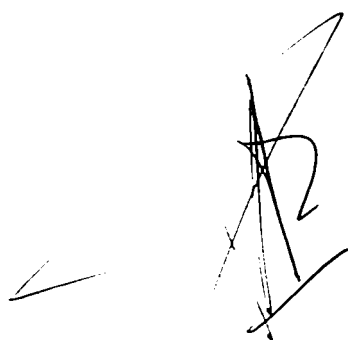
El desarrollo de las branquias externas depende de la presencia de las tres hojas embrionarias, tanto en el embrión como en condiciones de cultivo o de transplante; en cambio, las branquias internas son capaces de diferenciar en ausencia del ectodermo a partir del estadio de botón caudal.

Si bien las branquias externas participan en el intercambio gaseoso durante la embriogénesis temprana, los resultados experimentales obtenidos durante el presente trabajo demuestran que no son imprescindibles para el desarrollo de los embriones hasta estadios larvales, ya que éste se lleva a cabo normalmente en su ausencia. No sabemos si otros sitios de intercambio gaseoso (piel, etc) se modifican para compensar la ausencia de estos órganos, por lo que serían necesarios nuevos estudios al respecto.

La ultraestructura del epitelio de las crestas branquiales confirma su rol respiratorio: el epitelio se adelgaza progresivamente hacia los extremos y se encuentra en contacto directo con los vasos capilares.

Ha sido demostrada la expresión del Factor Natriurético Atrial en las branquias de larvas premetamórficas de *Bufo arenarum*, así como la presencia de gránulos secretorios similares a los encontrados en el corazón de la misma especie, los cuales son responsables de la secreción de FNA en ese órgano. El FNA podría estar involucrado en los mecanismos de osmorregulación y de intercambio iónico que se producen en las branquias internas de anuros. La presencia de gránulos secretorios en el epitelio de los filtros branquiales sugiere que estas estructuras podrían tener una función glandular además de mecánica.

El conjunto de los resultados expuestos demuestra la importancia del aparato branquial como modelo de estudio de las interrelaciones celulares durante el desarrollo, la activa participación de las branquias en los procesos de intercambio gaseoso y osmorregulación, y la plasticidad tisular que se verifica durante su diferenciación.



BIBLIOGRAFÍA

- AINIS, L., G. TAGLIAFIERRO, A. MAUCERI, A. LICATA, M. RICA y S. FASULO. (1995). Cytokeratin type distribution in the skin and gill epithelia of the Indian freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* as detected by immunohistochemistry. *Folia Histochem. Cytobiol.* 33 (2): 77-81.
- ALBERS, K. y E. FUCHS. (1992). The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.* 134: 243-279.
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS y J. D. WATSON. (1992). El Citoesqueleto. En: *Biología molecular de la célula*. Eds. Omega, Barcelona, 651-720 pp.
- ALVARADO, R. H. y A. MOODY. (1970). Sodium and chloride transport in tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Am. J. Physiol.*, 218: 1510-1516.
- AOKI, A., C. MALDONADO y W. G. FORSSMANN. (1988). Seasonal changes of the endocrine heart. En: *Functional Morphology of the Endocrine Heart*. (Eds. W.G. Forssmann, D.W. Scheuermann y J. Alt), Steinkopff Verlag Darmstadt, Springer-Verlag New York, pp. 61-68.
- ARENDT, R. M., E. STANGL, J. ZHRINGER, D.C. LIEBISH y A. HERZ. (1985). Demonstration and characterization of α -human atrial natriuretic factor in human plasma. *FEBS Lett.* 189: 57-61.
- ARENAS, M.I., B. FRAILE, M. DEMIGUEL y R. PANIAGUA. (1995). Intermediate filaments in the testis of the teleost mosquito fish *Gambusia affinis holbrooki*: a light and electron microscope immunocytochemical study and western blotting analysis. *Hist. J.* 27: 329-337.
- ASAI, J., M. NAKAZATO, H. TOSHIMORI, S. MATSUKURA, K. KANGAWA y H. MATSUO. (1987). Presence of atrial natriuretic polypeptide in pulmonary vein and vena cava. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1465-1470.
- ATKINSON, B. G. y J. J. JUST. (1975). Biochemical and histological changes in the respiratory system of *Rana catesbeiana* larvae during normal and induced metamorphosis. *Dev. Biol.* 45: 151-165.
- BALINSKY, B. I. (1948). Korrelationen in der Entwicklung der Mund und Kiemenregion und des Darmkanals bei Amphibien. *Roux. Arch.* 143: 365-395.
- BALINSKY, B.I. (1984). Desarrollo de los derivados ectodérmicos. En: *Introducción a la Embriología*. Ediciones Omega S.A., Barcelona, pp
- BENTLEY, P. J. y G. F. BALDWIN. (1980). Comparison of transcutaneous permeability in skins of larval and adult salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Am. J. Physiol.* 239: 505-508.
- BOAS, J. E. (1882). Über den Conus arteriosus und Arterienbogen der Amphibien. *Morph. Jahrb.* 7:488-572.

- BOELLI, E. J., P. GREENFIELD y B. HILLE. (1963). The respiratory function of gills in the larvae of *Ambystoma punctatum*. *Dev. Biol.*, 7:420-431.
- BOONKDOM, V. y R.H. ALVARADO. (1971). Adenosinetriphosphatase activity in gills of larval *Rana catesbeiana*. *Am. J. Physiol.* 220: 1820-1824.
- BOULTON, R. A. y H. J. HODGSON. (1995). Assessing cell proliferation: a methodological review. *Clin. Science.* 88: 119-130.
- BOUTILIER, R.G. (1988). Control of arrhythmic breathing in bimodal breathers: Amphibia. *Can. J. Zool.* 66: 6-19.
- BOUTILIER, R. G., D. G. McDONALD y D.P. TOEWS. (1980). Ventilation, circulation and blood acid-base balance in the aquatic gill-less urodele, *Cryptobranchus alleganiensis*; a comparison with the semiterrestrial anuran, *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* 84, 289-302.
- BRAVO, R. y H. MACDONALD-BRAVO. (1985). Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J.* 4: 655-661.
- BRAVO, R. y H. MACDONALD-BRAVO. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. Association with DNA replication sites. *J. Cell Biol.* 105: 1549-1554.
- BRAVO, R., R. FRANK, P. BLUNDELL y H. MACDONALD-BRAVO. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature.* 326: 515-517.
- BREDESEN, D. E.. (1995). Neural Apoptosis. *Annals Neurol.* 38(6): 839-851.
- BROADHEAD, C. L., U. O'SULLIVAN, C. DEACON y I.W. HENDERSON. (1992). Atrial Natriuretic peptide in the eel, *Anguilla anguilla* L.:its cardiac distribution, receptors and actions on isolated branchial cells. *J. Mol. Endocrinol.* 9: 103-114.
- BROERS, J.L., L. LEIJ, M. KLEIN-ROT, A. HAAR, E. LANE, I. LEIGH, S. WAFENAAR, G. VOOIJS y F. RAMAEKERS. (1989). Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues. *Different.* 40: 119-128.
- BROWDER, L. W., C. A. ERICKSON y W. R. JEFFERY. (1991). The cellular basis of morphogenesis. En: *Developmental Biology*. Saunders College Publishing, Florida, pp. 334-341.
- BURGGREN, W. W. y N. H. WEST. (1982). Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog. *Respir. Physiol.*, 47: 151-164.
- BURGGREN, W. W. y R. MOALLI. (1984). Active regulation of cutaneous gas exchange by capillary recruitment in amphibians: Experimental evidence and revised model for skin respiration. *Respir. Physiol.* 55: 379-392.

- BURGGREN, W. W. y J. J. JUST. (1992). Developmental changes in physiological systems. En: Chapter 16 - Environmental Physiology of Amphibians (Eds. M. Feder y W. W. Burggren). The University of Chicago Press, pp 467-529.
- CAMBAR, R. y MARROT. (1954). Table chronologique du developpement embryonnaire et larvaire du *Rana dalmatina*. Bull. Biol Fr. Belg. 88: 168-177.
- CAMBAR, R. y J. D. GIPOULOUX. (1956). Table chronologique du developpement embryonnaire et larvaire du crapaud commun: *Bufo bufo*. Bull. Biol. Fr. Belg., 90: 198-217.
- CANNATELLA, D. (2000). Architecture. Cranial and axial musculoskeleton. En: Tadpoles. The Biology of Anuran Larvae. (Ed.: R. W. McDiarmid y R. Altig). The Univ. of Chicago Press, Chicago. pp52-91.
- CANTIN, M., J. GUTKOWSKA, G. THIBAUD, R. MILNE, S. LEDOUX, S. MIN LI, C. CHAPEAU, G. GARCIA, P. HAMET y J. GENEST. (1984). Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the heart and salivary gland. Histochem. 80: 113-127.
- CARY, R. y M. KLYMKOWSKY. (1995). Disruption of intermediate filament organization leads to structural defects at the intersomite junction in *Xenopus* myotomal muscle. Devel. 121: 1041-1052.
- CASCO, V. H., C. MALDONADO y A. AOKI. (1989). Immunocytochemical localization of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in the heart of *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). Arch. Biol. Med. Exp. 22: R241, (Abst).
- CASCO, V. H.. (1992) Seasonal and induced changes of myoedocrine cells of *Bufo arenarum* Hensel. Tesis Doctoral - Universidad Nacional de Córdoba.
- CASCO, V. H., D.A. PAZ, G. RUIZ, C. MALDONADO, A. PISANO y A. AOKI. (1992). Differentiation of endocrine myocardiocytes in the developing heart of the toad (*Bufo arenarum*, Hensel). Int. J. Dev. Biol. 36: 537-542.
- CELIS, J.E. y A. CELIS. (1985). Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivisions of S phase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3262-3266.
- CHIU, K.W., Y.C. LEE y P.T. PANG. (1990). The vasorelaxant effects of Atrial Natriuretic Peptide in the frog. Gen. Comp. Endocrinol. 78: 42-47.
- CLARKE, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat. Embryol. 181: 195-213.
- CLEMENS, P. (1895) Die ausseren Kiemen der Wirbeltiere. Anat. Hefte. 5: 51-155.
- CLEVENGER, C.V., A.L. EPSTEIN, y K.D. BAUER. (1987). Modulation of the nuclear antigen p105 as a function of cell cycle progression. J. Cell Physiol. 130: 336-343.

- CONNELL, N. D. y J. G. RHEINWALD. (1983). Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells; reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34: 245-253.
- COULOMBE, P.A., M. HUTTON, A. LETAI, A. HERBERT, A. PALLER y E. FUCHS. (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analysis. *Cell* 66:1301-1311.
- CZOPEK, J. (1965) Quantitative studies on the morphology of the respiratory surfaces in amphibians. *Acta Anat.*, 62: 296-323.
- DAIDOJI, H., Y. TAKASAKI y P. NAKANE. (1992). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell Biochem. Funct.* 10: 123-132.
- DARFLER, M., y J.W. KARASZKIEWICZ. (1995). In situ localization of apoptosis using terminal deoxynucleotidyl transferase. *Focus* 17 (3): 81-83.
- DAVIDSON, E.H.. (1991). Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. *Devel.* 113: 1-26.
- DE SAINT-AUBAIN, M. L. (1981). Shunts in the gill filament in tadpoles of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *J. Exp. Zool.* 217:143-145.
- DE BOLD, A.J., H.B. BORENSTEIN, A.T. VERESS y H. SONNENBERG. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial extracts in rats. *Life Sci.* 28: 89-94.
- DEL CONTE, E. y J. L. SIRLIN. (1952). Pattern series of the first embryony stages in *Bufo arenarum*. *Anat. Rec.* 112: 125-136.
- DIETZ, T. H., y R. H. ALVARADO. (1974). Na⁺ and Cl⁻ transport across gill chamber epithelium of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Amer. J. Physiol.* 226: 764-770.
- DORAN, T. Y., A. VIDRICH y T. T. SUN. (1980). Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell* 22: 17-25.
- EARNSHAW, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 337-343.
- ECHEVERRIA, D. D. y L. E. FIORITO de LOPEZ. (1981) Estadios de la metamorfosis de *Bufo arenarum* (Anura). *Physis* (Buenos Aires), Secc. B, 40 (98): 15-23.
- EKMAN, G. (1913). Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung der Kiemenregion (Kiemenfäden und Kiemenspalten) einiger anuren Amphibien. *Morph. Jb.*, 47: 6-13.
- EKMAN, G.. (1922). Neue experimentelle Beiträge zur frühesten Entwicklung der Kiemenregion und Vorderextremität der Anuren. *Soc. Sci. Fennica Com. Biol.*, 1: 34-42.
- ELLIS, R. E., J. YUAN y R. HORVITZ. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698.

- FEUILLOLEY, M., L. YON, K. KAWAMURA, S. KIKUYAMA, J. GUTKOWSKA y H. VAUDRY. (1993). Immunocytochemical localization of Atrial Natriuretic (ANF)-like peptides in the brain and heart of the treefrog *Hyla japonica*: effect of weightlessness on distribution of immunoreactive neurons and cardiocytes. *J. Comp. Neurol.* 330: 32-47.
- FFRENCH-CONSTANT, C. (1992). A division too far? *Curr. Biol.* 2(11): 577-579.
- FOLEY, J. E., D. DIETRICH, J. SWENBERG y R. R. MARONPOT. (1991). Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *J. Histotechnol.* 14: 237-241.
- FOUQUET, B., H. HERRMANN, J. FRANZ y W. W. FRANKE. (1988). Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. III. Identification of mRNAs encoding cytokeratins typical of complex epithelia. *Devel* 104: 533-548.
- FOX, H. (1983). The external and internal gill filaments. En: *Amphibian morphogenesis*. Humana Press, New Jersey, pp. 114-117.
- FRANKE, W. W., E. SCHMID, M. OSBORN y K. WEBER. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 75: 5034-5038.
- FRANKE, W. W., D. SCHILLER, R. MOLL, S. WINTERS, E. SCHMID y I. ENGELBRECHT. (1981). Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.* 153: 933-959.
- FRANKE, W. W., D. SCHILLER, M. HATZFELD, T. MAGIN, J. L. JORCANO, S. MITTNACHT, E. SCHMID, J. COHLBERG y R. A. QUINLAN. (1984). Cytokeratins: complex formation, biosynthesis and interactions with desmosomes. En: *The Transformed Phenotype* (Eds. A. Levine, G. Vande Woude, W. Topp y J. D. Watson). Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, USA. pp. 177-190.
- FRICK, A. y A. TOYGAR. (1988). Lack of effect of rat Atrial Natriuretic Factor (rANF) on the renal function in frogs. *Comp Biochem Physiol.* 90A: 465-469.
- FRÖJDMAN, K., J. PARANKO, I. VIRTANEN y L.J. PELLINIEMI. (1993). Intermediate filament proteins and epithelial differentiation in the embryonic ovary of the rat. *Diff.* 55: 47-55.
- FUCHS, E. F., S. COPPOCK, H. GREEN y D. W. CLEVELAND. (1981). Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. *Cell.* 27: 75-84.
- FUCHS, E. F., A. TYNER, G. GUIDICE, D. MARCHUK, A. RAYCHAUDHURY y N. ROSENBERG. (1987). The human keratin genes and their differential expression. *Curr. Top. Dev. Biol.* 22: 5-34.
- GAVRIELI, Y., Y. SHERMAN y S. A. BEN-SASSON. (1992). Identification of programmed cell death in situ via labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
- GERDES, J., U. SCHWAB, H. LEMKE y H. STEIN. (1983). The production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 31: 13-20.

- GHIANI, P., B. UYA, A. MANDICH, Y M. A. MASINI. (1991). Atrial Natriuretic hormone and its receptors during development of the frog *Rana dalmatina*: preliminary observations. *Acta Embryol. Morphol. Exper. n.s.* 12 (1): 33-34.
- GILCHRIST, F.G. (1968) Frog Development. En: A survey of embryology. Mc Graw-Hill Inc., U.S.A. pp. 235-331.
- GLÜCKSMANN, A. (1950). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 26: 59-86.
- GOLDMAN, R., S. KHUON, Y. HAO CHOU, P. OPAL y P. STEINERT. (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* 134 (4): 971-983.
- GONZALES, M., M. MORALES y F. ZAMBRANO. (1979). Sulfatide content and (Na⁺K⁺)-ATPase activity of skin and gill during larval development of the Chilean frog, *Calyptocephalella caudiverbera*. *J. Membrane Biol.* 51: 347-359.
- GORDON, M.S. y V. TUCKER. (1965). Osmotic regulation in the tadpoles of the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *J. Exp. Biol.* 42: 437-445.
- GOSNER, K. L. (1960). A simplified table of staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetol.*, 16: 183-190.
- GRADWELL, N. (1969). The respiratory importance of the tadpole operculum in *Rana catesbeiana*. *Can. J. Zool.* 47: 1239-1243.
- GRADWELL, N. (1972 a). Gill irrigation in *Rana catesbeiana*. Part I. On the anatomical basis. *Can. J. Zool.* 50:481-499.
- GRADWELL, N. (1972 b). Gill irrigation in *Rana catesbeiana*. Part II. On the musculoskeletal mechanism. *Can. J. Zool.* 50:501-521.
- GRASSI MILANO, E. y C. CHIMENTI. (1995). Morphogenesis of the pancreas of *Bufo bufo* during metamorfosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 239-249.
- GUTKOWSKA, J. y M. NEMER. (1989). Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. *Endocrine Rev.* 10: 519-536.
- HARRISON, R. G. (1921) Experiments on the development of the gills in the amphibian embryos. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* 41: 156-168.
- HARRISON, R.G..(1933). Some difficulties of the determination problem. *Am. Natur.* 67:306-321.
- HAUSEN, P. y M. RIEBESELL. (1991). Organogenesis. En: The early development of *Xenopus laevis*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Germany, pp. 45-48.
- HEID, H. W., I. MOLL y W. W. FRANKE. (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissue: II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of

- trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differen.* 37: 215-230.
- HETTS, S.W. (1998). To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *J.A.M.A.* 279 (4): 300-307.
- HENGARTNER, M.O. (1997). Apoptosis and the shape of death. *Dev. Genet.* 21: 245-248.
- HILFER, S. R. y R. L. SEARLS. (1986). Cytoskeletal dynamics in animal morphogenesis. En: *Developmental Biology. Volume 2. The Cellular Basis of Morphogenesis* (Ed. L. W. Browder). Plenum Press, New York.
- HIROHAMA, T., H. UEMURA, S. NAKAMURA, M. NARUSE AND T. AOTO. (1989). Ultrastructure and Atrial Natriuretic Peptide (ANP)-like Immunoreactivity of Cardiocytes in Larval, Metamorphosing and Adult Specimens of the Japanese Toad, *Bufo japonicus formosus*. *Develop. Growth & Differ.* 31: 113-121.
- HOLTZER, H. (1968). Induction of chondrogenesis: a concept in terms of mechanisms. En: *Epithelial - Mesenchymal interactions*. (Eds: R. Gleischmajer y R.E. Billingham). Williams y Wilkins, Baltimore, pp. 152-164.
- HOUDRY, J. (1974) Étude des branchies internes puis de leur régression au moment de la métamorphose, chez la larve de *Discoglossus pictus* (Otth), Amphibien Anoure. *J. Microsc.*, 20: 165-182.
- HOWARD, A. y S. R. PELC. (1951). Nuclear incorporation of ^{32}P as demonstrated by autoradiographs. *Exp. Cell Res.* 2: 178-187.
- HUANG, F.L.S. AND W.K. SAMSON. (1991). An enkephalinergic mechanism for the hypothalamic effect of atrial natriuretic peptide to inhibit luteinizing hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.* 3: 127-135.
- HUETTNER, A. F. (1948). *Fundamentals of Comparative Embryology of the Vertebrates*. The Macmillan Company, New York, pp. 156-182.
- HUPPERTZ, B., H.G. FRANK y P. KAUFMANN. (1999). The apoptosis cascade. Morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol.* 200: 1-18.
- ICHIKAWA, M. (1934). Experimental analysis of the gill formation in the japanese urodele *Triturus pyrrhogaster*. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 10: 57-68.
- ICHIKAWA, M. (1938). Induction of gills in *Triturus pyrrhogaster* *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 14: 169-177.
- ISHIZUYA-OKA, A. y S. UEDA (1996). Apoptosis and cell proliferation in the *Xenopus* small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res.* 286:467-476.
- JACOBOWITZ, D., G. SKOFITSCH, H. KEISER, R. ESKAY y N. ZAMIR. (1985). Evidence for the existence of atrial natriuretic factor- containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 40: 92-94.

- JAMRICH, M., T. SARGENT e I. B. DAWID. (1987). Cell-type-specific expression of epidermal cytokeratin genes during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Genes & Develop.* 1:124-132.
- KARP, G. y N.J. BERRILL. (1981). *Organogenesis*. En: *Development*. Mc Graw- Hill Book Company, Nueva York, pp.397-431.
- KASPER, M. (1989). Patterns of cytokeratin/vimentin coexpression in the guinea pig. *Acta Histochem.* 86: 85-91.
- KASPER, M., T. RUDOLF, A. VERHOFSTAD, D. SCHUH Y M. MÜLLER. (1993). Heterogeneity in the immunolocalization of cytokeratin-specific monoclonal antibodies in the rat lung: evaluation of three different alveolar epithelial cell types. *Histochem.* 100: 65-71.
- KAWAHARA, H., M. CADRIN, G. PERRY, L. AUTILIO-GAMBETTI, S. SWIERENGA, J. METUZALS, N. MARCEAU y S. FRENCH. (1990). Role of cytokeratin intermediate filaments in transhepatic transport and canalicular secretion. *Hepatology.* 11: 435-448.
- KAWATA, M., K. NAKAO, N. MORII, Y. KISO, W. YAMASHITA, H. IMURA y Y. SANO. (1985). Atrial natriuretic polypeptide: topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neurosci* 16: 521-546.
- KERR, J. F., A. WYLLIE y A. CURRIE. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Canc.* 26: 239-257.
- KERR, J. F., G. GOBÉ, C. WINTERFORD y B. V. HARMON. (1995). Anatomical methods in cell death. En: *Methods in Cell Biology* (Eds. L. Schwartz y B. A. Osborne). Academic Press, London, pp. 1-27.
- KIM, S.H., K. CHO, K. SEUL, H. RYU y G.Y. KOH. (1989). Presence of immunoreactive atrial natriuretic peptide in follicular fluid, ovary and ovarian perfusates. *Life Sci.* 45: 1581-1589.
- KLOAS, W. (1993). Localization of binding sites for atrial natriuretic peptide and angiotensin II in gill and kidney of various fish species. En: *Fish, Ecotoxicology and Ecophysiology* (T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner, Eds.), VCH, Weinheim, pp. 367-384.
- KLYMKOWSKY, M. W. (1995). Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 46-54.
- KOO, H. y P. P. GRAZIADEI. (1995). Eye primordium transplantation in *Xenopus* embryo. *Anat. Embryol.* 191: 155-170.
- KOSEKI, C., D. HERZLINGER y Q. AL-AWQATI. (1992). Apoptosis in metanephric development. *J. Cell Biol.* 119: 1327-1333.
- KOUKLIS, P. D., E. HUTTON y E. FUCHS. (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J. Cell Biol.* 127(4): 1049-1060.
- KROEMER, G., N. ZAMZAMI y S.A. SUSIN. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today.* 18: 44-51.

- KURKI, P., M. VANDERLAAN, F. DOLBEARE, J. GRAY y E. M. TAN. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 166: 209-219.
- KUSAKABE, T. y T. KAWAKAMI. (1992). Distribution of CGRP, substance P, VIP, and somatostatin immunoreactive nerve fibers in the internal gills of larvae of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Arch. Histol. Cytol.* 55: 243-249.
- LAMACZ, M., P. NETCHITAILO, M.C. TONON, M. FEUILLOLEY, N. LING, G. PELLETIER y H. VAUDRY. (1987). Atrial Natriuretic Factor (ANF) stimulates the release of α -MSH from frog neurointermediate lobes in vitro. Interaction with dopamine, GABA, and neuropeptide Y. *Life Sci* 40: 1853-1857.
- LANE, E.B. y C. B. ALEXANDER. (1990). Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin. Cancer Biol.* 1: 165-179.
- LAZURE, C., H. ONG, N. MC NICOLL, P. NETCHITAILO, M. CHRÉTIEN, A. DE LÉAN AND H. VAUDRY. (1988) The Amino Acid Sequences of Frog Heart Atrial natriuretic-like Peptide and Mammalian ANF are Closely Related. *FEBS Lett.* 238: 300-306.
- LEIBOVICI, M., G. MONOD, J. GERAUDIE, R. BRAVO y M. MECHALI. (1992). Nuclear distribution of PCNA during embryonic development in *Xenopus laevis*: a reinvestigation of early cell cycles. *J. Cell Sci.* 102: 63-69.
- LIHRMANN, I., P. NETCHITAILO, M. FEUILLOLEY, M. CANTIN, C. DELARUE, F. LEBOULENGER, A. DE LÉAN y H. VAUDRY. (1988). Effect of atriac natriuretic factor on corticosteroid production by perfused frog interrenal slices. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 55-62.
- LOVTRUP, S. y A. PIGON. (1968). Observations on the gill development in frogs. *Ann. d'Embryol. Morphog.* 2: 3-13.
- MAETZ, J. (1972). Interaction of salt and ammonia transport in aquatic organisms. En: *Nitrogen metabolism and the environment* (Eds. J. Campbell y L. Goldstein). Acad. Press. 105-154 pp.
- MANDELKOW, E. y E. M. MANDELKOW (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 72-81.
- MANGOLD, O. (1936). Experimente zur Analyse der Zusammenarbeit der Keimblätter. *Naturwissenschaften*, 24: 753-760.
- MARKL, J. y W.W. FRANKE. (1988). Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout. Fundamental differences in expression patterns between fish and higher vertebrates. *Differ.* 39: 97-122.
- MARSHALL, A.M. (1893). The development of the frog. En: *Vertebrate Embryology*. Smith, Elder & Co. 160-185 pp.
- MARSHALL, A.M. (1932). The frog: an introduction to anatomy, histology and embryology. Macmillan & Co. Ltd, Londres. 131-140 pp.

- MARTIN, M. C. de, A. M. de NUÑEZ Y M. E. TOMATIS. (1985). Metamorfosis en anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Anura). Hist. Nat. 5 (32): 289-302.
- MATHEWS, M. B., R. BERNSTEIN, R. FRANZA y J. GARRELS. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature. 309: 374-6.
- MAURER, F. (1888). Die Kiemen und ihre Gefässe bei anuren und urodelen Amphibien, und die Umbildungen der beiden ersten Arterienbogen bei Teleostiern. Morph. Jahr. 14: 173-223.
- McINDOE, R. y D. G. SMITH. (1984). Functional anatomy of the internal gills of the tadpole of *Litoria ewingii* (Anura, Hylidae). Zoomorphol. 104: 280-291.
- McLEAN, W. H. I. y E. B. LANE. (1995). Intermediate filaments in disease. Curr. Opin. Cell Biol. 7:118-125.
- MICHAELS, J. E., J. T. ALBRIGHT y D. PATT. (1971). Fine structural observations on cell death in the epidermis of the external gills of the larval frog, *Rana pipiens*. Am. J. Anat. 132: 301-318.
- MIRANDA, L. (1995). Desarrollo y evolución de la pars distales hipofisaria y de las glándulas tiroideas durante la metamorfosi de *Bufo arenarum*. Tesis Doctoral. Biblioteca FCEN, UBA. Buenos Aires, Argentina. 208pp.
- MIYACHI, K., M. J. FRITZLER y E. M. TAN. (1978). An autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. 121: 2228-2234.
- MIYATA, A., N. MINAMINO, K. KANGAWA y H. MATSUO. (1988). Identification of 29-amino acid natriuretic peptide in chicken heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155-1330-1337.
- MOLL, R., W. W. FRANKE, D. SCHILLER, B. GEIGER y R. KREPLER. (1982). The catalogue of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 31: 11-24.
- MOLL, R., D. SCHILLER y W. W. FRANKE. (1990). Identification of proteins IF of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. J. Cell Biol. 111: 567-580.
- MOREL, G., J.G. CHABOT, T. GARCIA-CABALLERO, F. GOSSARD, F. DIHL, M. BELLES ISLES y S. HEISLER. (1988). Synthesis, internalization and localization of atrial natriuretic peptide in rat adrenal medulla. Endocrinol. 123: 149-158.
- MORI, C., N. NAKAMURA, Y. OKAMOTO, M. OSAWA y K. SHIOTA. (1994). Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. Anat. Embryol. 190: 21-28.
- MORI, C., N. NAKAMURA, S. KIMURA, H. IRIE, T. TAKIGAWA y K. SHIOTA. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. Anat. Rec. 242: 103-110.
- MORIUCHI, T. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a nuclear protein engaged in eukaryotic DNA replication for one billion years. Med Sci. Res. 18: 911-915.

- MOSER, F. (1940). The differentiation of isolated gills of the amphibian embryo. *J. Morph.* 66: 16-19.
- NAGLE, R. B. (1994). A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis. *Mol. Biol. Rep.* 19: 3-21.
- NAUE, H. (1890). Ueber Bau und Entwicklung der Kiemen der Froschlarven. *Z. Naturwiss.* 63: 129-176.
- NEGISHI, K., W. STELL, T. TERANISHI, A. KARKHANIS, V. OWUSU-YAW y Y. TAKASAKI. (1991). Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive cells in goldfish retina following intravitreal injection with 6-hydroxydopamine. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11: 639-659.
- NETCHITAILO, P., M. FEUILLOLEY, G. PELLETIER, M. CANTIN, A. DE LÉAN, F. LEBOULENGER AND H. VAUDRY. (1986a). Localization and Characterization of Atrial Natriuretic Factor (ANF)-like Peptide in the Frog Atrium. *Peptides* 7: 573-579.
- NETCHITAILO, P., M. FEUILLOLEY, G. PELLETIER, F. LEBOULENGER, A. ANDERSEN AND H. VAUDRY. (1986b). Localization of atrial natriuretic factor (ANF)-immunoreactive material in the hypothalamo-pituitary complex of the frog. *Neurosci. Lett.* 72: 141-146.
- NETCHITAILO, P., M. FEUILLOLEY, G. PELLETIER, F. LEBOULENGER, M. CANTIN, J. GUTKOWSKA AND H. VAUDRY. (1987). Atrial Natriuretic Factor-Like Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Frog. *Neurosc.* 22: 341-359.
- NETCHITAILO, P., L.M. FEUILLOLEY, G. PELLETIER, A. DE LEAN, H. ONG, M. CANTIN, J. GUTKOWSKA, F. LEBOULENGER AND H. VAUDRY. (1988). Localization and Identification of Immunoreactive Atrial Natriuretic Factor (ANF) in the Frog Ventricle. *Peptide* 9: 1-6.
- NETCHITAILO, P., T. YIAI, M. FELLOLEY, F. LEBOULENGER, A. ANDERSEN, G. PELLETIER, M. CANTIN AND H. VAUDRY. (1989). Distribution of Atrial Natriuretic Factor (ANF)-like immunoreactivity and ANF Binding Sites in the Brain and Pituitary of Amphibians. *Gen Com Endocrinol.* 74: 290-296.
- NIEUWKOOP, P.D. y J. FABER. (1956). *Normal Table of Xenopus laevis* (Daudin) (Eds. P.D. Nieukoop y J. Faber). North-Holland Publishing Co, Amsterdam.
- NISHIKAWA, A. y H. HAYASHI. (1994). Isoform transition of contractile proteins related to muscle remodeling with an axial gradient during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 165: 86-94.
- NISHIKAWA, A. y H. HAYASHI. (1995). Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. *Differ.* 59: 207-214.
- NOMURA, A. (1994). Nuclear distribution of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in fertilized eggs of the starfish *Asterina pectinifera*. *J. Cell Sci.* 107: 3291-3300.
- OBERHAMMER, F., J. WILSON, C. DIVE, I. MORRIS, J.A. HICKMAN, A. WAKELING, P. WALKER y M. SIKORSKA. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA into 300 and 1 or 50

- fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3684.
- OLSON, K.R. AND D.W. DUFF. (1993). Single-pass gill extraction and tissue distribution of atrial natriuretic peptide in trout. *Am. J. Physiol.* 265: R124-R131.
- ONG, H., C. LAZURE, T.T. NGUYEN, N. Mc NICOLL, N. SEIDAH, M. CHRÉTIEN y A. DE LEAN. (1987). Bovine adrenal chromaffin granules are a site of synthesis of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 957-963.
- OPPENHEIM, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453-501.
- ORTEGO, L.S., W. HAWKINS, W. WALKER, R. KROL y W. BENSON. (1994). Detection of proliferating cell nuclear antigen in tissues of three small fish species. *Biotechnic Histochem.* 69(6): 317-323.
- PAZ, D.A., G. RUIZ, V.H. CASCO AND A. PISANÓ. (1993). The presence of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in spermatozoa of *Bufo arenarum*, and effects of GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 31-37.
- PFEIFFER, C. J. y M. ASASHIMA. (1995). Ultrastructural cytology of the primitive lung of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 27 (4): 491-500.
- PISANÓ, A. (1957). Efficienza funzionale e strutturale dell'ipofisi di Anfibia mantenuta in medio oleoso. *Arch. Zool. Ital.*, 42: 221-227.
- PRELICH, G., C. K. TAN, M. KOSTURA, M. B. MATHEWS, A. K. SO, K. DOWNEY y B. STILLMAN. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature.* 326: 517-520.
- QUINLAN, R., D. SCHILLER, M. HATZFELD, T. ACHTSTAETTER, R. MOLL, J. JORCANO, T. MAGIN y W. W. FRANKE. (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann. NY. Acad. Sci.* 455: 282-306.
- RADICE, G., A. NEFF, Y. SHIM, J-J BRUSTIS y G. MALACINSKI. (1989). Developmental histories in amphibian myogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 33: 325-343.
- RAUNICH, L. (1942). Ricerche sullo sviluppo dell'apparato branchiale degli Anfibi. - I. Trapianti eterotopi omoplastici e xenoplastici negli Anuri. *Arch. Ital. Anat. Embr.*, 47: 738-764.
- RAUNICH, L. (1975). *Embriologia e morfogenesi*. Zanichelli, Bologna. 351 pp.
- REINECKE, M., C. HEYM AND W.G. FORSSMANN. (1992). Distribution patterns and coexistence of neurohormonal peptides (ANP, BNP, NPY, SP, CGRP, enkephalins) in chromaffin cells and nerve fibers of anuran adrenal organ. *Cell. Tiss. Res.* 268: 247-256.
- ROJO, M.C., M.J. BLANQUEZ y M.E. GONZALEZ. (1997). Ultrastructural evidence for apoptosis of pavement cells, chloride cells and hatching gland cells in the developing branchial area of the trout *Salmo trutta*. *J. Zool.* 243: 637-651.

- ROJO, M.C. y M.E. GONZALEZ. (1998). In situ detection of apoptotic cells by TUNEL in the gill epithelium of the developing brown trout (*Salmo trutta*). J. Anat. 193: 391-398.
- ROJO, M.C. y M.E. GONZALEZ. (1999). Ontogeny and apoptosis of chloride cells in the gill epithelium of newly hatched rainbow trout. Acta Zool. 80: 11-23.
- ROMER, A. S. (1973). Boca, Faringe y Organos respiratorios. En: Anatomia Comparada (Vertebrados). Nva. Edit. Interamericana, México, pp. 231-238.
- RUBEN, L., P. AHMADI, R. JOHNSON, D. BUCHHOLZ, R. CLOTHIER y S. SHIIGI. (1994). Apoptosis in the thymus of developing *Xenopus laevis*. Dev. Comp. Immun. 18(4): 343-352.
- RUBIN, L. L., D. PHILPOTT y S. BROOKS. (1993). The cell cycle and cell death. Curr. Biol. 3(6): 391-394.
- RUGH, R. (1951). The frog: its reproduction and development. McGraw-Hill Book Co., New York, pp 60-99.
- RUGH, R. (1964). Vertebrate Embryology. The dynamics of development. Harcourt, Brace & World, Inc., New York, pp 48-96.
- RUIBAL-ARES, B., N. RIERA y M. ELIZALDE de BRACCO. (1994). Apoptosis. Su papel en la ontogenia del sistema inmune y en la infección por HIV. Medicina. 54: 661-670.
- RYU, H., K.W. CHO, S.H. KIM, S.Z. KIM, S.H. OH, Y.H. HWANG AND G. Y. LEE. (1992). Frog lymph heart synthesizes and stores immunoreactive atrial natriuretic peptide. Gen. Comp. Endocrinol. 87: 171-177.
- SAKATA, J., K. KANGAWA AND H. MATSUO. (1988). Identification of New Atrial Natriuretic Peptides in Frog Heart. Biochem Biophys Res Comm. 155: 1338-1345.
- SCHÄFFER, S., S. TROYANOVSKY, H. HEID, L. ESHKIND, P. KOCH y W. FRANKE. (1993). Cytoskeletal architecture and epithelial differentiation: molecular determinants of cell interaction and cytoskeletal filament anchorage. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316: 1316-1323.
- SCHEIDE, J. AND J.A. ZADUNAISKY. (1988). Effect of atriopeptin II on isolated opercular epithelium of *Fundulus heteroclitus*. Am. J. Physiol. 254: R27-R32.
- SCHMIDT, G. A. (1937). Entwicklung der äusseren Kiemen aus dem Ectoderm der Anuren und dem Entomesoderm von Triton. Zool.Anz., 117: 124-132.
- SCHOFIELD, J.P., D. JONES y N. FORREST. (1991). Identification of C-type natriuretic peptide in heart of spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) Am. J. Physiol. 261: F734-F739.
- SCHULZE, F. E. (1889). Über die inneren Kiemen der Batrachierlarven. I. Mitteilung. Über das Epithel der Lippen, der Mundrachen und Kiemenhöhle erwachsener Larven von *Pelobates fuscus*. Abh. Dtsch. Akad. Wiss Berlin, 1: 1-58.
- SCHULZE, F. E. (1892). Über die inneren Kiemen der Batrachierlarven. II. Mitteilung, Skelett, Muskulatur, Blutgefäße, Filterapparat, Respiratorische Anhänge und Atmungsbewegungen erwachsener Larven von *Pelobates fuscus*. Abh. Dtsch. Akad. Wiss Berlin, 1: 1-66.

- SEKI, S., H. SAKAGUCHI y N. KANAKITA. (1990). Identification and fine structure of proliferating hepatocytes in malignant and non-malignant liver disease by use of a monoclonal antibody against DNA polymerase alpha. *Hum. Pathol.* 20: 1020-1030.
- SEVERINGHAUS, S. E. (1930). Gill Development in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* 56: 1-30.
- SGONC, R. y G. WICK. (1994). Methods for the detection of apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 327-332.
- SHI, Y. B. (2000). *Amphibian Metamorphosis. From morphology to molecular biology.* Wiley-Liss, New York, 288 pp.
- SKOFITSCH, G., D.M. JACOBOWITZ, R. ESKAY y N. ZAMIR. (1985). Distribution of atrial natriuretic factor-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neurosci.* 16: 917-948.
- SLACK, J.M. (1991). *From egg to embryo: regional specification in early development.* Cambridge University Press, New York.
- STEINERT, P. M. y R. K. LIEM. (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell.* 60: 521-523.
- STONE, L. S. (1926). Further experiments on the extirpation and transplantation of mesectoderm in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* 44: 95-131.
- STONE, R.A. y C.C. GLEMBOTSKY. (1985). Immunoreactive atrial natriuretic peptide in the eye: molecular forms in anterior uvea and retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 1022-1028.
- STRAWINSKI, S. (1956). Vascularisation of respiratory surfaces in ontogeny of the edible frog, *Rana catesbeiana*. *Zool. Polon.* 7: 327-365.
- SUN, T. T., R. EICHNER, A. SCHERMER, D. COOPER, W. G. NELSON y R. A. WEISS, (1984). Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epidermal keratins: a unifying model. En: *The Transformed Phenotype* (Eds. A. Levine, W. Topp, G. van de Woude y J. Watson). Cold Spring Harbor Lab. Press., Cold Spring Harbor, NY, pp. 169-176.
- TAKEI, Y., A. TAKAHASHI, T. WATANABE, K. NAKAJIMA y S. SAKAKIBARA, (1989). Amino acid sequence and relative biological activity of eel atrial natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 537-543.
- TAN, C. K., C. CASTILLO, A. G. SO y K. M. DOWNEY, (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase- δ from foetal calf thymus. *J. Biol. Chem.* 261: 12310-12316.
- TANAKA, I., K.S. MISOMO y T. INAGAMI (1984). Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma. Determination by specific radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 663-668.
- TATA, J.R., B.S. BAKER, I. MACHUCA, E.M. RABELO y K. YAMAUCHI (1993). Autoinduction of nuclear receptor genes and its significance. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 46: 105-119.

- TATA, J. R. (1994). Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem. Cell Biol.* 72: 581-588.
- TEI, S., B. SANTARELLA, R.M. FARNESI y D. VAGNETTI (2000). Ultrastructural analysis and cytochemical localization of Atrial Natriuretic Peptide-stimulated guanylate cyclase in internal gills of *Bufo bufo* tadpoles. *Eur. J. Morphol.* 38 (1): 41-50.
- THIBAUD, G., C. LAZURE, E. SCHIFFRIN, J. GUTKOWSKA, L. CHARTIER, R. GARCIA, N. SEIDAH, M. CHRÉTIEN, J. GENEST y M. CANTIN. (1985). Identification of a biologically active circulating form of rat atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 981-986.
- TONG, Y., P. NETCHITAILO, F. LEBOULENGER, H. VAUDRY, G. PELLETIER. (1989) Localization of atrial natriuretic factor (ANF) binding sites in the central nervous system of the frog. *J. Comp. Neurol.* 281:384-396.
- TOSHIMORI, H., K. TOSHIMORI, C.H. OURA AND H. MATSUO. (1987). Immunohistochemical study of atrial natriuretic polypeptides in the embryonic, fetal and neonatal rat heart. *Cell Tiss. Res.* 248: 627-633
- TSENG, S. C. G., M. JARVINEN, W. NELSON, J.W. HUANG, J. WOODCOCK-MITCHELL y T. T. SUN. (1982). Correlation of Specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell.* 30: 361-372.
- TURECKOVÁ, J., H. LESOT, J.L VONESCH, M. PETERKA, R. PETERKOVÁ y J.V. RUCH. (1996). Apoptosis is involved in the disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 483-489.
- UCHIYAMA, M., T. MURAKAMI y H. YOSHIKAWA. (1990a). Notes on the development of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Zool. Sci.* 7: 73-78.
- UCHIYAMA, M., H. YOSHIKAWA, C. WAKASUGI y C. OGURO. (1990b). Structure of the internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Zool. Sci.* 7: 623-630.
- UCHIYAMA, M. y H. YOSHIKAWA. (1992). Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog. *Cell Tiss. Res.* 267: 35-44.
- UEDA, S., S. MINAMINO, T. SUDOH, K. KANGAWA y H. MATSUO. (1988). Regional distribution of immunoreactive brain natriuretic peptide in porcine brain and spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 733-739.
- UEDA, N. y S. V. SHAH. (1994). Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.* 124: 169-177.
- UEMURA, H., M. NARUSE, T. HIROHAMA, S. NAKAMURA AND T. AOTO. (1989). Immunoreactive Atrial Natriuretic Peptide in Heart and Plasma of the Toad, *Bufo japonicus formosus* During Breeding and non Breeding Seasons. *Proc Japan Acad.* 65B: 84-86.

- UVA, B.M., M.A. MASINI, L. NAPOLI AND M. DEVECCHI. (1993). Immunoreactive atrial natriuretic-like peptide in antarctic teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* 104 A: 291-297.
- VALLARINO, M., M. MATHIEU, C. PINELLI y R. K. RASTOGI. (1998). Organization of atrial natriuretic factor-like immunoreactive system in the brain of the frog *Rana esculenta* during development. *Cell Tissue Res.* 293: 47-55.
- VASSAR, R., P. A. COULOMBE, L. DEGENSTEIN, K. ALBERS y E. FUCHS (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell.* 64: 365-380.
- VENABLE J. H.. y R. COGGESHALL. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscope. *J. Cell Biol.* 25: 407-408.
- VIERTEL, B. (1991). The ontogeny of the filter apparatus of anuran larvae (Amphibia, Anura). *Zoomorphology.* 110: 239-266.
- VIERTEL, B. y S. RICHTER. (2000). Anatomy. Viscera and Endocrines. En: Tadpoles. The Biology of Anuran larvae. (Ed. R. McDiarmid y R. Altig). The University of Chicago Press, Chicago. pp.92-148
- WADDINGTON, C.H. (1940). *Organisers and genes*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 169 pp.
- WARKENTIN, K. M. y R. J. WASSERSUG (2001). Do prostaglandins regulate external gill regression in anurans?. *J. Exp. Zool.* 289: 366-373.
- WASSERSUG, R. (1980). Internal oral features of larvae from eight Anuran families: functional, systematic, evolutionary and ecological considerations. Univ. of Kansas, Museum of Nat. Hist. Misc. Publ. N° 68.
- WASSERSUG, R. y K. ROSENBERG. (1979). Surface anatomy of branchial food traps of tadpoles: a comparative study. *J. Morphol.* 159: 393-426.
- WEICHERT, C. K. y W. PRESCH (1981). Desarrollo de las branquias. En: Elementos de anatomía de los cordados. McGraw - Hill, México. 346 pp
- WEST, N. H. y B. VAN VLIET. (1992). Sensory mechanisms regulating the cardiovascular and respiratory systems. En: Environmental Physiology of the Amphibians (Eds. M. E. Feder y W. W. Burggren). The University of Chicago Press, Chicago, pp. 151-182.
- WHITNEY, W. U. (1867). Metamorphosis of the tadpole. *Trans. Roy. Micro. Soc.* 15: 43-55.
- WINKLBAUER, R. (1988). Cell proliferation in ectodermal explants from *Xenopus* embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 197: 141-147.
- WITSCHI, E. (1956). Development of vertebrates. W. B. Saunders Company, Filadelfia, pp 78-84.
- WYLLIE, A. H. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. En: Cell Death in Biology and Pathology (Eds. I. Bowen y R. Lockshin). Chapman and Hall, London, pp. 9-34.

- YAMAGUCHI, M., T. DATE y A. MATSUKAGE. (1991). Distribution of PCNA in *Drosophila* embryo during nuclear division cycles. *J. Cell Sci.* 100: 729-733.
- YAOITA, Y. y D. BROWN. (1991). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev.* 4: 1917-1924.
- ZIVIN, R.A., J. CONRA, R. DIXON, N. SEIDAH, M. CHRÉTIEN, M. NEMER, M. CHAMBERLAND y J. DROUIN. (1984). Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6325-6329.